This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

+ *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
+ *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
+ *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
+ *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

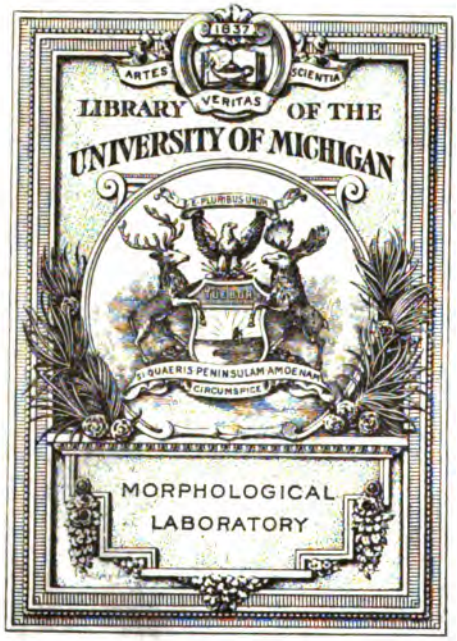
About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at `http://books.google.com/`

BUHR B

a39015 00005784 7b

Digitized by Google



Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

QH
207
.L48
1896

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

TRAITÉ

DES MÉTHODES TECHNIQUES

DE

L'ANATOMIE MICROSCOPIQUE

Digitized by Google

Digitized by Google

TRAITÉ

DES MÉTHODES TECHNIQUES

DE

L'ANATOMIE MICROSCOPIQUE

HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE

PAR

ARTHUR BOLLES LEE ET L. FÉLIX HENNEGUY

AVEC UNE PRÉFACE

DE M. RANVIER

Membre de l'Institut
Professeur au Collège de France

Deuxième édition entièrement refondue
ET CONSIDÉRABLEMENT AUGMENTÉE

PARIS
OCTAVE DOIN, ÉDITEUR
8, PLACE DE L'ODÉON, 8

1896
Tous droits réservés.

Digitized by Google

Digitized by Google

PRÉFACE DE M. RANVIER

Les auteurs de ce livre m'ont demandé de les présenter au public. Ils sont trop modestes, car ils sont parfaitement connus de tous ceux qui s'occupent de sciences biologiques.

Ils diront comment ils ont fait leur ouvrage, comment ils ont été conduits à collaborer. J'ajouterai que cette collaboration a été heureuse et que l'œuvre qui en est sortie rendra de grands services.

La technique histologique, depuis quelques années, a fait de notables progrès et a beaucoup étendu son domaine. Les zoologistes et les embryologistes lui ont emprunté ses méthodes et les ont modifiées quelquefois pour les mettre en rapport avec la nature de leurs recherches. Leur but, en effet, est un peu différent de celui que poursuivent les histologistes ; ils sont intéressés moins par la structure des tissus qui composent les animaux complètement formés ou en voie de développement que par la disposition et la signification morphologique de leurs organes. Or, les embryons, et souvent les plus intéressants parmi les animaux sans vertèbres, sont trop petits, trop délicats, trop mous ou trop

Digitized by Google

friables pour que l'on puisse les anatomiser utilement par la simple dissection. Il a fallu, par des procédés ingénieux et à l'aide d'instruments perfectionnés, faire violence à la nature pour lui arracher ses secrets. Les biologistes, à l'exemple de Prométhée, le sublime voleur, doivent pénétrer dans le sanctuaire pour y dérober le feu sacré. Ils peuvent y aller sans crainte : Jupiter n'est plus là pour les clouer sur le rocher, et MM. Bolles Lee et Henneguy leur serviront de guides.

L. Ranvier.

Paris, le 21 novembre 1886.

Digitized by Google

AVANT-PROPOS DE M. A. BOLLES LEE

Cette deuxième édition diffère considérablement de la précédente. La distribution générale de l'ouvrage reste bien à peu près ce qu'elle était; mais le détail a subi des modifications importantes, parmi lesquelles nous pouvons signaler les suivantes :

Préoccupé du désir d'être un guide pour l'étudiant à travers le dédale toujours embrouillé de notre sujet, j'ai laissé beaucoup plus que jadis se manifester la note personnelle. Un plus grand nombre de méthodes vieillies ont été supprimées; et parmi celles qui ont été conservées j'ai cru utile d'indiquer le plus souvent celles qui d'après mon expérience me paraissent les meilleures. L'introduction générale de l'ouvrage a été refondue et augmentée, et j'ai ajouté aux chapitres spéciaux de nombreux paragraphes d'introduction. Ces paragraphes donnent des explications détaillées sur la marche à suivre dans les divers genres de recherches, et expliquent en même temps les *principes* sur lesquels sont fondées les diverses méthodes de la technique moderne.

J'ai écrit un chapitre nouveau de généralités sur les Teintures. J'ai insisté sur l'importance des nouveaux colorants à l'acide carminique et à l'hématéine de Paul Mayer, et j'ai expliqué en détail la théorie des teintures histologiques faites au moyen

Digitized by Google

de ces deux corps colorants. Les trois chapitres qui traitent de ces matières ont été soumis à la critique du savant distingué que je viens de nommer, lequel s'est fait, comme on le sait, une spécialité de ce sujet. Cette critique s'est étendue jusqu'aux détails les plus minutieux. Nous avons la plus grande obligation à M. le Dr Mayer de la façon généreuse dont il a mis à notre disposition son savoir et sa peine, et nous tenons à lui en exprimer ici, M. Henneguy et moi, toute notre reconnaissance. Ce précieux concours nous permet d'affirmer que cette partie si importante de notre sujet a été traitée d'une manière conforme à la science la plus récente.

Les paragraphes traitant des colorations régressives par les couleurs dérivées de la houille (161 à 166) sont entièrement nouveaux, de même que la plus grande partie du chapitre consacré à la Safranine et aux autres colorants nucléaires de ce groupe. On trouvera également beaucoup de nouveautés dans le chapitre des *Colorations combinées*, parmi lesquelles des colorations plasmatiques récentes qui sont très importantes. J'ai donné avec soin les procédés les plus récents de coloration par mordançage. Près d'un chapitre entier a été consacré au bleu de méthylène. Le chapitre des *Méthodes cytologiques* a été refondu. Les méthodes récentes pour l'étude du système nerveux, tant central que périphérique, ont reçu tout le développement que demande ce sujet si important : elles occupent maintenant à elles seules plus de 40 pages de la deuxième partie, sans parler des méthodes d'imprégnation qui ont été exposées dans la première partie. On y trouvera exposées avec toutes leurs variantes les méthodes classiques de Weigert et de Golgi.

Le travail entier de la préparation du texte de cette nouvelle édition a été fait par moi seul. Je n'ai pas pu me concerter avec M. Henneguy sur les modifications à y apporter. Je suis donc seul responsable de toutes les modifications et de toutes les additions (à l'exception des contributions de Henneguy, mentionnées dans le texte, au chapitre des *Méthodes*

Digitized by Google

embryologiques et à celui des *Méthodes cytologiques*). Les épreuves ont été lues par chacun de nous. Nous avons constaté à cette lecture qu'il n'y avait point de dissidences importantes dans notre manière de voir. Cependant, pour sauvegarder nos responsabilités respectives, j'ai fait la rédaction *au singulier* toutes les fois qu'il s'agissait d'une recommandation ou d'une opinion sur laquelle nous aurions pu ne pas être tout à fait du même avis.

ARTHUR BOLLES LEE.

Nyon, Suisse, le 30 décembre 1895.

Digitized by Google

Digitized by Google

AVANT-PROPOS DE LA PREMIÈRE ÉDITION

L'année dernière, M. Arthur Bolles Lee publiait en Angleterre un excellent livre ayant pour titre : *The Microtomist's Vade-Mecum*[1], renfermant la plupart des méthodes techniques employées en anatomie microscopique et principalement les méthodes modernes en usage à la station zoologique de Naples et dans les laboratoires d'Allemagne et d'Angleterre. Heureux de trouver réunis dans ce petit volume, et intelligemment groupés, les renseignements que j'avais été obligé de chercher laborieusement dans les nombreux mémoires où ils se trouvent disséminés, je pensai qu'il serait utile de faire profiter les histologistes français du travail consciencieux de M. Bolles Lee, et je proposai à l'auteur de faire traduire son ouvrage.

La réponse de M. Bolles Lee fut des plus aimables. Non seulement il consentait à laisser publier une édition française de son Vade-Mecum, mais encore il voulait bien en faire lui-même la traduction, en modifiant plusieurs parties de l'ouvrage, et me demandait de me charger de la rédaction de quelques chapitres trop peu développés dans l'édition anglaise, chapitres que mes études spéciales me permettaient de traiter avec une

[1] *The Microtomist's Vade-Mecum, a handbook of the methods of microscopic Anatomy*, by Arthur Bolles Lee. London, J. and A. Churchill, 1885.

Digitized by Google

certaine expérience. Dans de semblables conditions, ma tâche devenait aussi facile qu'agréable.

Le présent volume n'est donc pas une simple traduction du *Microtomist's Vade-Mecum*. L'ouvrage a été mis au courant des acquisitions les plus récentes de la technique microscopique. Certaines méthodes surannées et plusieurs formules de réactifs infidèles ont été supprimées. Il en a été de même du chapitre relatif à la bactériologie, qui, pour être complet, aurait comporté un développement hors de proportions avec celui des autres parties. Cette suppression était du reste tout indiquée, l'étude des Microbes étant du domaine de l'anatomie pathologique, et ses méthodes se trouvant maintenant exposées dans des traités spéciaux. Plusieurs chapitres ont été au contraire entièrement remaniés et très étendus, tels que ceux relatifs à l'embryologie, à la cytologie, aux centres nerveux, etc.

Notre traité n'est pas destiné aux débutants qui n'ont jamais manié le microscope ; il ne renferme pas, en effet, la description des instruments ni la manière de s'en servir, description qui tient une large place, trop large peut-être, dans la plupart des traités de micrographie publiés jusqu'à ce jour. Il s'adresse aux travailleurs, à tous ceux qui font des préparations microscopiques, soit pour l'étude, soit pour des recherches originales. Sa place est sur la table de travail, comme celle du Formulaire de thérapeutique est sur le bureau ou dans la poche du praticien. Il renferme à la fois la grammaire et le dictionnaire de la technique microscopique. Des tables très détaillées permettent de trouver facilement et rapidement le renseignement cherché.

La première partie comprend les méthodes générales de l'anatomie microscopique applicables aux tissus animaux : fixation, durcissement, coloration, inclusions, coupes, injections, macérations, etc. A chacune de ces opérations correspondent les réactifs employés, leur action, leur formule et leur mode de préparation. J'ajouterai que toutes les citations ont été prises,

Digitized by Google

autant que possible, aux sources mêmes ; que celles-ci sont indiquées avec le plus grand soin, afin que le lecteur puisse, en cas de besoin, recourir au texte original ; que beaucoup des méthodes que nous donnons ont été en outre vérifiées expérimentalement par nous-mêmes, et qu'enfin plusieurs sont nouvelles ou encore inédites.

La seconde partie est consacrée à l'exposé de quelques méthodes spéciales, embryologiques et histologiques, pouvant servir de guides pour les recherches à entreprendre aussi bien sur les Invertébrés que sur les Vertébrés. Nous avons insisté surtout sur les méthodes nouvelles, renvoyant le lecteur, pour tout ce qui est classique, au remarquable *Traité* de notre éminent maître M. le professeur Ranvier.

Je tiens à remercier M. Bolles Lee de l'honneur qu'il m'a fait de vouloir bien me considérer comme son collaborateur, quoique mon rôle se soit borné, en somme, à la rédaction des méthodes relatives à l'embryologie, à la cytologie et aux Protozoaires, et à la revision de la traduction faite par l'auteur. Cette faible part de collaboration me permet de dire que M. Bolles Lee aura rendu un grand service aux histologistes en codifiant, pour ainsi dire, la technique moderne.

L.-F. Henneguy.

Paris, le 26 novembre 1886.

Digitized by Google

Digitized by Google

TRAITÉ DES MÉTHODES TECHNIQUES

DE

L'ANATOMIE MICROSCOPIQUE

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODES GÉNÉRALES ET RÉACTIFS

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

1. Préparation préalable et préparation ultérieure. — Après un examen superficiel des pages qui vont suivre, le lecteur novice pourrait bien éprouver un moment d'embarras à la vue des nombreuses méthodes et formules que nous nous proposons de lui faire connaître. Qu'il se rassure ! Nous allons essayer, moyennant un groupement rationnel de nos matériaux, d'introduire un peu d'ordre dans ce dédale apparent. En effet, la plupart de ces procédés, qui paraissent être faits pour effrayer par leur nombre et leur désordre, ne sont que des procédés accessoires, destinés à élucider des détails très spéciaux ; beaucoup d'entre eux s'emploient très rarement, et tous viennent se grouper naturellement autour de deux ou trois *Méthodes normales* typiques.

En premier lieu, on peut distinguer, dans la technique de n'importe quel genre de recherche microtomique, deux étapes : la *préparation préalable* et la *préparation ultérieure*. Or, la *préparation préalable est essentiellement identique dans toutes les méthodes ;* les divergences se montrent surtout dans les détails de la préparation ultérieure. Par préparation préalable nous entendons cet ensemble de manipulations que les naturalistes allemands appellent *Conservirungsmethoden*, et qui a pour but effectivement de rendre les tissus

Digitized by Google

propres à se conserver à travers toutes les opérations ultérieures auxquelles ils doivent être soumis. Cette étape comprend : 1° l'opération de tuer d'une manière appropriée l'animal à étudier ; 2° la fixation des tissus ; 3° les lavages et autres manipulations ayant pour but de les débarrasser de l'agent fixateur et de remplacer ce dernier par un liquide conservateur ou par tout autre réactif qu'on désire employer.

Nous donnons un peu plus loin la description générale des opérations de la préparation préalable, et nous passons tout de suite à la considération de la préparation ultérieure.

2. Préparation ultérieure par la voie humide et par la Méthode de déshydratation. — La préparation ultérieure se fait toujours par l'une ou l'autre des deux méthodes : la *voie humide* et la *méthode de déshydratation*. Suivant la première méthode, les colorations, les lavages et toutes les opérations préliminaires, de même que la conservation définitive, se font avec des *milieux aqueux;* suivant la seconde, on *déshydrate* les objets pour les étudier dans le baume ou quelque milieu semblable, qui sert également à les conserver en préparations permanentes.

Un objet conservé dans la glycérine diluée est un exemple de la première de ces méthodes ; un objet monté dans le baume, un exemple de la deuxième. On doit nécessairement employer la méthode de préparation par la voie humide toutes les fois qu'il s'agit d'étudier l'objet dans un milieu n'ayant pas la *haute réfringence* des résines que nous sommes obligés d'employer pour la conservation des préparations déshydratées, et même toutes les fois qu'il est indispensable d'éviter, autant que possible, le ratatinement des éléments qui accompagne toujours, nonobstant toutes les précautions, la déshydratation des tissus. On doit également l'employer pour l'examen de *tissus frais* toutes les fois qu'on désire connaître leur structure avant qu'elle ait été altérée par l'effet de réactifs qui leur enlèvent leur eau naturelle.

Mais, toutes les fois qu'il n'existe pas de semblables raisons pour préférer la voie humide, il convient d'employer la méthode de déshydratation. Nous voulons dire que, dans la technique moderne, la *méthode de préparation par déshydratation est la méthode principale*, et la méthode de préparation par la voie humide, la méthode accessoire. Et il en est ainsi pour deux motifs. On trouve en général, à part les exceptions que nous avons indiquées, que les préparations au baume, convenablement faites, montrent mieux les rapports des éléments et donnent des vues d'ensemble plus instructives que les

Digitized by Google

préparations faites dans les milieux aqueux ; et l'on trouve en tout cas et sans aucune exception qu'elles se conservent infiniment mieux en préparations permanentes. Il est aujourd'hui reconnu que l'éloignement, aussi complet que possible, de l'eau des tissus est essentiel pour la permanence de la conservation.

3. Préparation d'objets entiers et méthode des coupes. — La préparation par déshydratation se divise à son tour en deux branches, selon qu'il s'agit de la préparation d'*objets entiers* ou de la confection de *coupes* de ces objets. Mais remarquons tout de suite que nous n'avons pas là deux méthodes distinctes, mais simplement deux degrés d'élaboration d'une seule et même méthode. La marche à suivre dans les deux cas est identique pour la majeure partie des opérations. La méthode des coupes ne se sépare de celle qu'on emploie pour les objets entiers que par les manipulations spéciales nécessaires pour la confection même des coupes. C'est ce que démontrera immédiatement un coup d'œil au tableau ci-dessous.

	A. — Fixation.
	B. — Lavage pour enlever l'excès de fixateur.
	[*C*. — Coloration, si l'on désire le faire à ce stade.
	D. — Lavage, si l'on a coloré.]
*E*¹. — Passage à un milieu d'étude aqueux (ceci termine la préparation par *voie humide*).	*E*. — Passage par des alcools successifs (ici on peut colorer) jusqu'à l'alcool absolu (ceci commence la préparation par déshydratation).
	F. — Pénétration par une essence.
*G*¹. — Montage au baume (ceci termine la préparation par déshydratation d'un *objet entier*).	*G*. — Bain de paraffine (ceci commence la confection des *coupes*).
	H. — Coupes.
	I. — Collage des coupes sur porte-objets.
	J. — Enlevage de la paraffine par une essence.
	[*K*. — Enlevage de l'essence par l'alcool.
	L. — Coloration si on ne l'a pas fait auparavant.
	M. — Lavage.
	N. — Alcool absolu.
	O. — Essence.]
	P. — Baume.

Comme on le voit, si l'objet a été coloré en bloc au stade C ou E, la méthode des coupes ne diffère de celle qui est employée pour les objets entiers que par l'intercalation des stades G — J entre F et G¹, c'est-à-dire entre l'alcool et le baume.

Digitized by Google

4. Procédés spéciaux. — Par l'une et l'autre de ces méthodes, l'anatomiste ébauche son travail, et souvent même l'achève. Ensuite vient, s'il y a lieu, l'étude de points spéciaux à l'aide de méthodes spéciales, telles que l'examen des éléments des tissus à l'état vivant et *in situ*, ou bien dans des « liquides indifférents » ; telles aussi que l'emploi de colorants divers, ou la dissociation par des procédés mécaniques ou par la macération ; puis, la décalcification, la dépigmentation, etc.

Nous allons essayer de donner dans les paragraphes suivants de ce chapitre une description suffisante de ces méthodes générales, et nous réserverons pour des chapitres spéciaux la discussion des points de détail et des procédés auxiliaires.

5. Fixation et lavage. — La préparation d'un organisme ou d'un tissu quelconque doit toujours débuter par la Fixation de ses éléments. Le mot *fixation* implique deux choses : les éléments doivent être tués avec une rapidité suffisante pour ne pas leur laisser le temps de changer de forme ou de quitter l'attitude qui leur est propre pendant la vie ; — et ils doivent en même temps acquérir, par l'effet du réactif, un degré de durcissement qui les mette en état de résister à toutes les manipulations subséquentes et à l'action des réactifs les plus divers, sans se déformer. On ne saurait trop insister sur ce point, qui est d'une importance capitale. Sans une bonne fixation, les objets ne sauraient fournir ni de bonnes colorations, ni de bonnes coupes, ni aucune autre sorte de préparations ayant de la valeur.

L'objet ayant été soumis à l'action de l'un des agents fixateurs que nous allons étudier dans le chapitre suivant, il est, en général, nécessaire de lui faire subir un Lavage soigné, dans le but d'éloigner des tissus jusqu'aux moindres traces de l'agent fixateur. Cela est nécessaire d'abord parce qu'une action trop prolongée des substances coagulantes dont on se sert pour fixer serait préjudiciable à la conservation des éléments, puis aussi parce qu'il est en général nécessaire de le faire dans l'intérêt des procédés de coloration et d'imbibition avec des milieux d'une réfringence voulue dont on se servira dans la suite.

La manière dont ces lavages doivent se faire n'est point indifférente. Si l'on a fixé à l'acide osmique ou à l'acide chromique, le lavage se fait généralement à l'eau. Mais si l'on a fixé avec l'acide picrique, par exemple, il est nécessaire d'éviter de laisser agir l'eau sur les tissus, et on la remplace par l'alcool. La pratique se fonde ici non seulement sur des considérations relatives aux diverses solubilités des réactifs en question, mais aussi sur des considérations d'un ordre

Digitized by Google

tout autre, que voici. Les acides que nous avons mentionnés en premier lieu, de même que tous les composés des métaux lourds dont on se sert comme agents fixateurs, paraissent former des combinaisons chimiques avec les éléments des tissus, qu'ils rendent insolubles dans l'eau ; de sorte que le durcissement opéré par ces réactifs peut résister au traitement par l'eau. L'acide picrique, au contraire, ne paraît nullement entrer en une combinaison semblable avec les éléments des tissus, et ne leur donne pas de durcissement persistant. Si l'on fait le lavage à l'eau, l'acide se laisse entièrement enlever, tout en laissant les tissus dans un état mou dans lequel ils subissent l'action nuisible de l'eau qui les gonfle et les désagrège. Heureusement, l'alcool sert à enlever l'acide et à durcir les éléments en même temps. Nous aurons soin d'indiquer la manière dont il convient de faire des lavages pour chacun des réactifs fixateurs dont nous traiterons.

6. Précautions contre la déformation par les courants osmotiques ou de diffusion. — Dans la préparation de toutes les sortes d'objets, mais surtout d'organes ou d'organismes *entiers* et revêtus d'un tégument peu perméable aux liquides, il faut veiller à ce qu'il ne se produise pas de gonflements des tissus par endosmose lors de leur passage de l'un des liquides employés à un liquide de densité moindre, ni des ratatinements lors du passage à un liquide de densité plus grande. (Cet inconvénient se fait surtout sentir au moment du passage du dernier alcool à l'essence éclaircissante, mais il existe aussi à toutes les étapes de la préparation, c'est pour cela que nous en parlons ici.) Pour l'éviter, on a soin, autant que possible, d'inciser largement les téguments de l'objet que l'on prépare, pour que les deux liquides puissent se mêler librement et rapidement. Ensuite on a soin de faire en sorte que le *passage de l'un à l'autre liquide soit rendu aussi graduel que possible.* Cela peut se faire de deux manières.

S'il s'agit de porter l'objet dans un liquide *moins dense* que celui où il se trouve, il faut, autant que possible, le faire passer par des bains successifs de mélanges des deux liquides qui contiennent une proportion toujours croissante du deuxième liquide. Veut-on passer de l'eau à l'alcool fort, il est bon de passer par des bains successifs d'alcool au tiers, d'alcool à 70 p. 100, d'alcool à 90 p. 100 et finalement d'alcool à 95 p. 100. (Cela vaut mieux que d'ajouter par petites quantités de l'alcool fort à l'eau où se trouve la préparation, procédé qui donne lieu à un dégagement de bulles d'air dans le liquide, ce

Digitized by Google

qui est à éviter.) Veut-on transporter dans de l'alcool à 70 ou à 90 p. 100 un objet qu'on vient de fixer avec un fixateur aqueux, on aura soin d'y porter l'objet au moyen d'une pipette ou d'une petite cuillère, de sorte qu'il se trouve enveloppé dans une petite atmosphère de liquide aqueux à laquelle l'alcool ne se mêlera que lentement. Cela suffira le plus souvent, mais il est des objets très délicats qui rendent désirable l'emploi de précautions encore plus minutieuses.

Pour de tels objets il convient de disposer un appareil servant à régler la diffusion. On peut mettre les objets avec un peu de liquide, dans un tube bouché à l'un de ses bouts et fermé à l'autre par un diaphragme de peau de chamois ou une autre membrane convenable, puis plonger ce tube dans un récipient qui contient de l'alcool du titre auquel on désire passer, et laisser le tout jusqu'à ce que, par diffusion lente à travers la membrane, le liquide du tube et celui du récipient soient devenus de densité égale. Ou l'on peut employer le « différentiateur » de COBB, dont on trouvera la description dans *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, V, 1890, p. 157, ou dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 821. Ou bien, ce qui sera en général plus commode, l'appareil de HASWELL. (*Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, VI, 1891, p. 433 et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 696.) Cet appareil consiste en deux flacons de lavage réunis par un tube et portant, en outre, l'un un tube de dégagement pour le trop-plein, l'autre un tube à robinet ou à pince, qui le relie à un réservoir d'alcool du titre auquel on veut arriver. On met dans le premier flacon les objets avec un peu du liquide dans lequel ils se trouvent ; on met également un peu de ce même liquide dans le deuxième flacon ; puis on ouvre le robinet. Le mélange de liquides se fait donc dans le flacon qui ne contient pas les objets, et c'est ce mélange qui est graduellement conduit, par le siphon qui réunit les deux flacons, dans le liquide primitif qui contient les objets. Citons aussi l'appareil à déshydratation rapide de CHEATLE, *Journ. of Pathol. and Bacteriol.*, I, 1892, p. 253, ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 892.

Si, au contraire, il s'agit de porter l'objet dans un liquide *plus dense* que celui où il se trouve, on emploiera, selon les cas, soit la méthode de bains successifs de liquides mélangés, ou bien l'élégante méthode imaginée par GIESBRECHT, pour opérer le passage graduel de l'alcool absolu à une essence éclaircissante. Elle consiste à mettre le liquide éclaircissant *sous* l'alcool qui contient les pièces à éclaircir. Par exemple, on verse dans un récipient convenable — un verre de montre ou mieux un petit tube — quelques gouttes d'essence de cèdre ou de girofle, on verse doucement sur l'essence une quantité suffisante d'alcool. Ou bien, on verse l'alcool en premier lieu et l'on introduit ensuite l'essence sous l'alcool à l'aide d'une pipette. On met les objets à éclaircir dans l'alcool. Ils nagent d'abord à la surface de séparation des deux liquides, où ils se trou-

Digitized by Google

vent dans un milieu mixte dont la densité augmente aussi graduellement que possible de haut en bas. Ils se pénètrent peu à peu d'un milieu qui est un mélange des deux liquides employés, et à mesure qu'ils s'en pénètrent ils l'échangent de nouveau par diffusion contre un milieu toujours plus dense. Ils passent donc par gradations insensibles à travers des mélanges de densité croissante, jusqu'à ce qu'ils soient entièrement pénétrés par le liquide plus dense. Alors ils tombent au fond de ce dernier ; on enlève avec une pipette l'alcool qui surnage, et l'opération est terminée.

Cette méthode est de beauconp *plus délicate* que celle qui consiste à faire pénétrer les objets successivement par un mélange de deux parties d'alcool et d'une partie d'essence, par un mélange d'une partie d'alcool et d'une partie d'essence, et ainsi de suite ; méthode que nous voyons cependant pratiquer journellement.

Il va sans dire qu'on peut opérer de même lorsqu'il s'agit de liquides aqueux ; par exemple, pour passer de l'eau à la glycérine.

7. Coloration d'objets entiers. — Après cette digression sur la manière de faire passer les objets à travers les divers réactifs, reprenons notre revue de la marche normale de la préparation. Nous avons décrit la fixation et les lavages ; la préparation préalable est terminée. On peut maintenant, si l'on veut, procéder à la *coloration des tissus*. On peut bien ajourner cette opération, et colorer en détail après que les coupes ou les dissections nécessaires auront été faites. Cela peut être même rendu nécessaire par certaines considérations, telles que le trop grand volume de l'objet, qui peut faire obstacle à la coloration ou bien la nécessité de contrôler de près la coloration et la décoloration, ainsi qu'il faut le faire si l'on désire pratiquer des colorations nucléaires selon la méthode régressive ou méthode de Flemming, avec des couleurs d'aniline.

Naturellement si l'objet est destiné à être conservé en entier, et non à être débité en coupes, c'est maintenant qu'il faut le colorer. S'il s'agit au contraire de faire des coupes, les deux voies sont ouvertes, et l'étudiant pourra nous demander laquelle il vaut mieux suivre. Or il ne paraît pas utile de former une règle générale à cet égard. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que personnellement nous avons à peu près abandonné la pratique de colorer en masse les objets destinés à être coupés. La coloration des coupes présente le grand avantage de permettre à l'opérateur de suivre pas à pas le progrès de la teinture et d'y apporter de temps à autre toute modification qu'il voudra. Les colorations par les couleurs d'aniline, qui ont pris de nos

Digitized by Google

jours une si grande importance, ne se peuvent pratiquer en général que sur des coupes, et c'est là une considération des plus importantes. Mais ce genre de colorations demande une certaine adresse, et pour ce motif le débutant fera peut-être bien de s'en tenir à l'ancienne méthode et de colorer en bloc par un procédé éprouvé, tel que celui du carmin au borax de Grenacher. Nous donnerons du reste des explications plus détaillées sur ce sujet au chapitre DES TEINTURES.

8. Déshydratation et conservation. — La coloration une fois faite, il se peut que la préparation se trouve bien près d'être achevée. Si l'on ne désire faire ni coupes, ni dissections, il ne reste plus qu'à transporter l'objet dans le liquide « additionnel » ou conservateur dans lequel on veut l'étudier ou le conserver, et le monter sur porte-objets en préparation permanente ou temporaire. Nous parlerons au long de ces liquides dans les chapitres XVII et XIX, et nous nous bornerons à rappeler ici que ce transport doit être fait d'une manière aussi graduelle que possible, comme nous l'avons expliqué au numéro 6.

Le passage à travers des alcools successifs jusqu'à l'alcool absolu ou très fort s'appelle « déshydratation ».

Ce passage forme une étape de la préparation qui nous présente comme une pause naturelle, où l'on peut s'arrêter si l'on veut. En effet, si l'on désire ne pas pousser la préparation plus loin pour le moment, il n'y a qu'à laisser les objets dans l'alcool à 70 p. 100 jusqu'à ce qu'on désire les soumettre à des manipulations ultérieures. Il vaut en général mieux ne pas prendre pour cette « conservation » des pièces de l'alcool plus fort. Car par l'action déshydratante et coagulante prolongée de l'alcool fort les tissus se trouvent altérés dans leur structure intime ; ils deviennent durs et cassants, et se ratatinent, et leur capacité de fournir à la teinture des colorations précises se trouve être sérieusement diminuée.

KULTSCHITZKY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 349) a proposé de remédier à cet inconvénient en conservant les pièces dans de l'éther, ou dans du xylol ou du toluol (toluène), liquides qui n'ont pas cette action sur les tissus. FLEMMING (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 685) recommande de les conserver dans un mélange (environ à parties égales) d'alcool, de glycérine et d'eau. Les pièces ainsi conservées souffrent beaucoup moins, soit sous le rapport de leur consistance, soit sous celui de leur capacité de coloration, que les pièces alcooliques. Et cette méthode a en outre l'avantage qu'elle permet ou bien de préparer les objets pour l'inclusion dans la paraffine par un simple traitement par l'alcool, ou bien de les ramollir rapidement pour la dissection ou pour la dissociation par un simple traitement avec de l'eau. Nous pouvons recommander cette méthode que nous avons beaucoup pratiquée. Nous ajoutons souvent au liquide un peu d'acide acétique (0,5 p. 100 environ).

Toutefois, si les pièces sont destinées à être coupées dans la paraffine,

Digitized by Google

nous recommandons de procéder aussitôt à l'inclusion et de les garder dans la paraffine même ; elles s'y conservent admirablement sous tous les rapports. (Je viens, à titre d'essai, de couper et de colorer (en teinture double par le Kernschwarz et la safranine) une pièce qui a été conservée dans la paraffine depuis six ans et huit mois. La coloration est moins énergique que celle des coupes qui ont été prélevées sur l'organe le jour même de son inclusion, mais elle est largement aussi précise, et elle me semble même plus belle. La conservation des cellules, sans être parfaite, parait cependant excellente. La pièce est devenue un peu friable et se coupe mal.)

La plupart des auteurs recommandent de pousser la déshydratation par l'alcool jusqu'au titre d'*alcool absolu*, avant de passer à l'essence éclaircissante qui sert d'intermédiaire entre l'alcool et le baume ou la paraffine. Or *il n'est pas nécessaire* d'aller jusqu'à alcool absolu ; l'alcool à 90 p. 100 ou au surplus à 95 p. 100 suffira dans la plupart des cas. Car la trace d'eau qui peut rester dans les tissus après qu'ils ont été traités par de l'alcool de ces degrés se laissera parfaitement éloigner par le bain d'essence, pourvu qu'on ait soin d'employer une essence qui soit un bon agent éclaircissant. L'essence de bois de cèdre prendra bien toute l'eau qui reste dans les tissus après traitement par l'alcool à 95 p. 100 ; l'essence de bergamote éclaicira après l'alcool à 90 p. 100, et l'huile d'aniline après l'alcool à 70 p. 100.

9. Éclaircissement et dissections fines. — Les objets une fois déshydratés doivent maintenant être pénétrés soit par une essence ou un autre agent éclaircissant, s'ils sont destinés à être montés tout de suite dans le baume, ou par la même essence ou un autre dissolvant de la paraffine soit autre masse d'inclusion si l'on veut en faire des coupes. Pour le détail de ces opérations nous renvoyons aux chapitres AGENTS ÉCLAIRCISSANTS, LIQUIDES ADDITIONNELS.

Il reste cependant à noter ici que si l'objet doit subir une *dissection fine* à la loupe, c'est pendant qu'il se trouve dans l'essence qu'il convient le plus souvent de faire cette opération. Nous recommandons beaucoup à cette fin l'essence de bois de cèdre, qui prête aux tissus une consistance très favorable, pendant qu'en même temps sa viscosité considérable aide à soutenir les éléments délicats. L'essence de girofles a la propriété de rendre très cassants les tissus qui y ont séjourné quelque temps, c'est là une qualité qui peut être utile ou non selon les cas. Cette essence a aussi la propriété de ne pas s'étaler largement à la surface du verre, mais d'y former des gouttes très convexes ; c'est là aussi une qualité dont on peut tirer parti.

10. Inclusion et coupes. — Les coupes se font par l'une ou l'autre des MÉTHODES D'INCLUSION dont nous donnons l'exposition détaillée au chapitre XXI et aux suivants. Nous notons seulement ici qu'il y a deux méthodes principales d'inclusion, la méthode de la paraffine et la méthode du collodion. Les avis sont encore partagés sur la valeur

Digitized by Google

respective de ces deux méthodes. Nous admettons, et en cela nous sommes certainement d'accord avec la grande majorité des anatomistes, que le procédé à la paraffine est la méthode par excellence pour les petits objets (c'est-à-dire des objets n'ayant pas plus de 7 millimètres environ de diamètre) ; tandis que le procédé au collodion convient mieux pour les objets très volumineux.

11. Traitement définitif des coupes. — Les coupes une fois obtenues, il ne reste plus (si l'objet a déjà été coloré en entier) qu'à en éloigner la paraffine au moyen d'un dissolvant convenable, et à les monter dans le baume. Cela se fait en général à l'aide du *collage des coupes en séries sur le porte-objets*. Les coupes ayant été faites à sec (c'est-à-dire sans que le rasoir ait été mouillé pendant qu'elles se faisaient) sont rangées en ordre sur un porte-objets enduit de collodion ou de l'une des autres substances qui ont été préconisées à cet effet, de la façon que nous expliquerons au chapitre XXIV. On porte alors le tout à la température de fusion de la paraffine, on chasse la paraffine fondue avec une goutte d'un dissolvant convenable (du xylol, par exemple), on ajoute une goutte de baume de Canada et un couvre-objets, et la préparation est terminée.

Si la coloration n'a pas déjà été faite, voici comment on procède. Au lieu de porter les coupes dans le baume, on éloigne avec de l'alcool la substance qui a servi à dissoudre la paraffine, on les porte dans la solution colorante, et après coloration on lave, on déshydrate, l'on éclaircit de nouveau et l'on monte.

12. Résumé et observations additionnelles. — Voici en très abrégé un cadre de marche générale que nous recommandons à l'étudiant débutant. Fixez au sublimé ; lavez à l'eau d'abord ; puis longuement à l'alcool à 50 p. 100 ; colorez au carmin boracique alcoolique de Grenacher ; décolorez comme il est dit au paragraphe qui traite de ce réactif ; passez par des alcools successifs de la manière que nous avons dite au numéro 6 ; éclaircissez par de l'essence de bois de cèdre, et montez au baume, si vous ne désirez pas faire des coupes. Si vous désirez faire des coupes, au lieu de mettre la pièce dans le baume, vous la mettez dans un bain de paraffine et procédez comme il est dit au chapitre XXI ; coupez ; collez les coupes sur la lamelle avec le collodion de Schællibaum ; enlevez la paraffine avec du xylol, et montez directement dans le baume.

L'étudiant qui s'est perfectionné dans cette marche pourra ensuite aborder une variante un peu plus difficile. Au lieu de fixer par le

Digitized by Google

sublimé, il pourra prendre le liquide de Flemming; et, au lieu de colorer l'objet entier, il pourra colorer les coupes (collées sur porte-objets par l'albumine de Mayer), avec la safranine ou le bleu Victoria. Ce n'est qu'après s'être perfectionné dans l'art de la teinture par la méthode de Flemming avec un seul colorant que nous lui conseillerions de s'essayer à une coloration double, telle que par le violet de gentiane suivi de la fuchsine acide.

Nous engageons beaucoup le lecteur à consulter l'admirable exposition des principes de la technique histologique moderne qui a été donnée par PAUL MAYER dans les *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, II, 1881, p. 1. (On en trouvera des comptes rendus dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, II, 1882, p. 866-881, et *Amer. Natural.*, XVI, 1882, p. 697-706, ces derniers mentionnant quelques améliorations qui avaient été imaginées depuis la publication du travail de MAYER.)

Digitized by Google

CHAPITRE II

EXTENSION, FIXATION ET DURCISSEMENT

13. Introduction. — Par le mot *fixation* des tissus, on a coutume d'entendre les diverses opérations qui ont pour effet de tuer d'une façon instantanée les éléments anatomiques, tout en leur conservant la forme qu'ils possédaient pendant la vie, et en leur prêtant un degré de durcissement artificiel qui leur permet de subir sans se déformer l'action des substances colorantes, durcissantes, éclaircissantes, isolantes, enrobantes, — en un mot, toutes les manipulations chimiques et physiques qu'on désire mettre en œuvre pendant le cours de la préparation ultérieure.

Voici un exemple qui servira à faire comprendre l'utilité des agents fixateurs. Si l'on traite une portion de rétine vivante soit avec de l'humeur aqueuse de l'œil, soit avec du sérum, soit avec n'importe lequel des liquides dits *indifférents* des micrographes, ou avec l'une ou l'autre des liqueurs *conservatrices* qu'on emploie pour la conservation permanente des pièces histologiques, on trouve invariablement que les cônes et bâtonnets ne conservent que pendant un temps très court l'apparence qu'ils ont pendant la vie ; après quelques minutes au plus, on voit commencer une série de changements *post mortem*, à la suite desquels les segments externes soit des cônes, soit des bâtonnets se brisent en un certain nombre de disques et deviennent à la fin désintégrés au point d'être entièrement détruits. Puis encore, dans la même préparation, on observera qu'en un temps tout aussi court les fibrilles nerveuses, de lisses qu'elles étaient pendant la vie, deviennent variqueuses, présentant un grand nombre de nœuds fusiformes, pour ne point parler des autres altérations *post mortem* qu'elles subissent. Si, au contraire, nous traitons une rétine vivante avec une solution concentrée d'acide osmique, nous trouverons, après vingt-quatre heures,

Digitized by Google

que la totalité des cônes et des bâtonnets est parfaitement conservée, et que les fibrilles nerveuses ne montrent que peu ou point de varicosités. Et après ce durcissement préliminaire nous pouvons traiter la rétine avec de l'eau (procédé qui ruinerait entièrement une rétine non fixée), nous pouvons même la laver dans de l'eau pendant des jours entiers, sans qu'elle en souffre ; nous pouvons la colorer, la durcir, la déshydrater, l'enrober, la couper au microtome, et monter les coupes dans un milieu résineux ou aqueux, sans que ses éléments aient éprouvé d'altération sérieuse par suite de ces manipulations.

Il résulte de tout ce que nous venons de dire que la fixation des tissus est la condition *sine quâ non* de toute préparation à laquelle on veut donner une valeur scientifique (nous parlons de préparations normales de parties molles, cela va de soi). « On a proposé depuis longtemps des liquides qui auraient la propriété de conserver indéfiniment les tissus qu'on y a mis à l'état frais ; mais, en réalité, aucun de ces liquides ne possède ces avantages. Il n'est pas à dire pour cela qu'on ne puisse avoir des préparations persistantes des éléments de l'organisme même les plus délicats ; pour atteindre ce but, il convient d'employer, non pas un seul liquide conservateur, mais une série de réactifs, dont les uns servent à fixer les éléments dans leur forme et à les rendre plus ou moins inaltérables, d'autres à les colorer, d'autres enfin à les mettre à l'abri de modifications ultérieures. » (Ranvier.)

14. Précautions préliminaires. Extension mécanique. — Dans la grande majorité des cas, on commence la préparation d'un objet en soumettant l'organe ou l'organisme à étudier à l'action aussi complète et aussi immédiate que possible de l'un des agents fixateurs que nous allons étudier. Et cela se fait en prenant l'organe ou l'organisme à l'état vivant et normal ; on se fie alors à l'agent fixateur pour produire, avec la rapidité voulue, en même temps la mort de l'organisme et la mort des éléments des tissus. On ne peut cependant pas agir ainsi dans tous les cas. Il est des tissus qui, au moment où l'on fait agir sur eux les réactifs dont nous allons parler, se rétractent, se plissent, et donneraient de mauvaises préparations si l'on ne parvenait à les maintenir en l'état d'extension physiologique pendant la fixation.

S'agit-il d'éléments allongés, soit plats, soit filiformes, il suffit souvent de les placer sur une lame de verre et d'en fixer les deux extrémités avec de la cire à cacheter ou avec une goutte de paraffine fondue. Ainsi pour les tendons et les petits muscles. Ou bien on peut

Digitized by Google

mettre en œuvre le procédé de RANVIER (*Traité*, p. 729) pour les nerfs à myéline. « On prend une petite tige de bois (une allumette par exemple) dans laquelle on pratique un évidement; au niveau de celui-ci on dispose le nerf et on le fixe au degré d'extension convenable au moyen de ligatures placées à ses deux extrémités. » Puis on porte le tout dans le liquide fixateur.

Pour les membranes, on peut les tendre, comme la peau d'un tambour, sur un verre de montre, un petit godet, ou le goulot d'un flacon, et les y attacher avec un tour de fil. On trouvera très commodes pour cette opération les anneaux histologiques des HOGGAN et d'ÉTERNOD que nous décrirons au chapitre des IMPRÉGNATIONS. Des organes membraneux tels que la vessie peuvent être maintenus en extension en les gonflant au moyen d'une seringue, soit d'un liquide indifférent, soit du liquide fixateur lui-même.

Le procédé de la « demi-dessiccation » (RANVIER, *Traité*, p. 69) « consiste à étendre sur une lame de verre une membrane à l'aide des doigts appliqués sur ses bords. Tant que la membrane est humide, elle se rétracte du moment qu'on l'abandonne à elle-même. Mais lorsqu'elle commence à sécher (et par suite de la chaleur des doigts qui la tendent, elle sèche plus vite sur les bords), ses bords restent adhérents au verre, et en l'attirant successivement sur ses différents côtés, on arrive à la tendre d'une façon très complète ».

On trouvera d'autres indications, très détaillées, dans le classique *Traité* de RANVIER.

15. Extension par intoxication. — Il est bon nombre d'animaux, de consistance molle, manquant de squelette rigide, et doués d'une puissance considérable de contractilité — les Cœlentérés, les Bryozoaires, les Serpulides en fournissent assez d'exemples — qui, si on les traite sans autre précaution par un agent fixateur, se contractent avec violence, retirent leurs tentacules ou leurs branchies, et meurent en un état recoquillé qui fait de l'objet conservé une caricature de la vie.

Les animaux *qui ne se contractent que lentement*, tels que *Alcyonium* et *Veretillum*, et quelques Tuniciers, tels que *Pyrosoma*, peuvent être tués en extension si on les jette brusquement dans un liquide fixateur assez énergique pour les tuer avant que leurs éléments n'aient eu le temps de se contracter.

L'acide acétique cristallisable (méthode de van BENEDEN) est un excellent réactif à cette fin, et réussit, par exemple, très bien avec *Pyrosoma* et certaines Méduses (voy. au chapitre V et chapitre XXXIII). Le sublimé corrosif, surtout à chaud, donne aussi souvent de bons résultats.

Digitized by Google

L'application brusque de la CHALEUR est aussi un procédé dont on peut tirer parti. Par ce moyen, les éléments sont fixés en même temps que les organes sont immobilisés. C'est aussi une méthode qui a l'avantage de se prêter mieux qu'aucune autre à l'examen micro-chimique des tissus, car elles n'y introduit rien qui puisse en altérer la composition ni gêner les réactions.

Il suffira en général d'exposer les animaux pendant quelques secondes à une chaleur suffisante. On peut mettre de petits objets tels que Protozoaires, Hydraires, Bryozoaires, dans une goutte d'eau placée dans un verre de montre ou sur une lamelle, et les flamber au-dessus d'une lampe à alcool. Des animaux plus grands peuvent être jetés brusquement dans une quantité d'eau chauffée préalablement. On conserve très bien les grands Némertiens en les jetant dans de l'eau douce chauffée. On peut aussi mettre les pièces dans une très petite quantité d'eau contenue dans un tube de verre et plonger ce tube pendant quelques secondes dans de l'eau bouillante. Aussitôt fixées, les pièces doivent être passées dans l'alcool (50 p. 100 environ).

La difficulté de cette méthode consiste à atteindre la température mortelle sans la dépasser de plus de quelques degrés. Il ne faut guère aller au delà de 80° C., en aucun cas, et une chaleur de 60° C. suffira très souvent. C'est en somme une méthode qui peut rendre des services, mais il ne faut pas trop s'y fier dans les recherches histologiques délicates, car le moindre excès de chaleur provoque des gonflements très considérables de certains éléments cellulaires.

Mais dans le cas d'*animaux qui se contractent très rapidement*, on est souvent obligé d'avoir recours à l'immobilisation préalable par un des procédés d'intoxication ou d'anesthésie que nous allons décrire.

16. Fumigation au tabac (HERTWIG, *Die Actinien*, 1879). — On place les animaux dans une cuvette avec de l'eau, et on les recouvre d'une cloche de verre ou d'un cristallisoir, destiné à confiner la fumée de tabac. On fait alors passer de la fumée sous la cloche par le moyen d'un tube de verre courbé. Après y avoir introduit une quantité suffisante de fumée, on abandonne les animaux pendant quelques heures, afin que la narcotisation puisse se compléter. On constate le progrès de l'anesthésie en irritant l'animal de temps à autre ; aussitôt qu'on observe qu'il ne réagit plus que lentement, que, par exemple, si l'on touche un tentacule avec une aiguille, cet organe ne commence à se rétracter qu'après un laps de temps considérable, on peut estimer que le sujet est suffisamment engourdi. On verse alors dans l'eau une dose de liquide fixateur suffisante pour le tuer avant qu'il ait eu le temps de changer d'attitude ; et, une fois qu'il est parfaitement mort, on peut changer à volonté le liquide où il se trouve.

Digitized by Google

Si l'on nous demande notre avis quant à l'utilité de cette méthode, nous dirons qu'elle peut rendre de réels services, et nous conseillerons de l'essayer toutes les fois qu'on n'est pas arrivé au but par une voie plus commode. La fumigation produit, par exemple, chez les Actinies, une bien véritable intoxication qui sert parfaitement à les maintenir étalées ; mais cet état ne s'établit que lentement : il faut plusieurs heures pour produire l'immobilité voulue chez une Actinie.

En conséquence, c'est un procédé peu agréable à appliquer, c'est pourquoi l'on a imaginé le suivant.

17. Nicotine. — Andres (*Atti R. Acad. dei Lincei*, V, 1880, p. 9 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.* (N. S.), II, 1882, p. 884) a imaginé d'employer la nicotine en solution aqueuse, au lieu de l'administrer sous forme de fumée de tabac. Il se sert d'une solution d'un gramme de nicotine dans un litre d'eau de mer. Il place l'animal à narcotiser dans un bocal contenant un demi-litre d'eau, et il y conduit la solution de nicotine très graduellement par le moyen d'un fil faisant siphon. La grosseur du fil doit être telle qu'il puisse vider le litre de solution de nicotine en douze heures.

18. Chloroforme. — D'autres substances anesthésiques peuvent être ajoutées par petites quantités à l'eau qui contient les animaux à endormir. Le chloroforme donne quelquefois de très bons résultats quand il est employé de cette manière ; nous avons vu de belles Méduses très bien chloroformées dans une attitude parfaitement étalée, en une heure ou deux de temps. Il convient de projeter le chloroforme, par quantité de quelques gouttes à la fois, vigoureusement dans l'eau avec une petite seringue ou une pipette munie d'une poire de caoutchouc, l'une ou l'autre ayant l'orifice assez petit pour que le chloroforme soit pulvérisé à la sortie. On répète la dose toutes les cinq minutes, jusqu'à ce que l'animal soit immobilisé. Notons ici que Andres a trouvé que cette méthode ne convient pas pour les Actinies, car chez ces animaux la macération des tissus survient avant que l'insensibilité soit établie.

Pour obtenir de bonnes coupes de la tige très contractile des Siphonophores, Korotneff (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, V, Hft 2, 1884, p. 229 ; *Zeit. f. wiss. Mikroskopie*, 2, 1885, p. 230) commence par anesthésier les animaux avec la vapeur de chloroforme. On attend que les animaux se montrent un peu tranquilles dans le bocal qui les contient. On fait flotter alors sur l'eau un verre de montre contenant du chloroforme, et l'on couvre le tout avec une cloche. Le chloro-

Digitized by Google

forme endort les Siphonophores, qui demeurent étalés. On enlève alors la cloche, et l'on fixe les animaux en les inondant subitement d'acide chromique ou de sublimé chaud.

19. L'alcool et l'éther peuvent s'employer de la même manière que le chloroforme. Pour les Actinies, Andres a obtenu de bons résultats avec le mélange suivant (dû à S. Lo Bianco) : glycérine, 20 parties ; alcool (70 degrés), 40 parties ; eau de mer, 40 parties. Il faut verser ce liquide avec précaution sur l'eau qui contient les animaux, et attendre qu'il s'y soit mêlé lentement par diffusion. Il faut pour cela souvent plusieurs heures. C'est ainsi que Eisig emploie l'alcool.

20. Alcool méthylique (Cori, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1890, p. 438). — Ce réactif a l'avantage, entre autres, de n'avoir que peu d'action sur les albumines. On fait un mélange de 10 cc. d'alcool méthylique, et 90 cc. d'eau de mer ou d'eau douce (si on prend de l'eau douce on ajoute 6 grammes de chlorure de sodium). On ajoute ce mélange par petites quantités à l'eau qui contient les animaux ; et si cela ne suffit pas, on les inonde du mélange non dilué. On peut ajouter au mélange quelques gouttes de chloroforme.

21. Chloral. — Foettinger (*Archives de Biologie*, VI, p. 115) a obtenu des résultats très complets avec l'hydrate de chloral. Il opère en laissant tomber au fond du vase qui contient les animaux quelques cristaux de chloral. Pour des Alcyonelles, il emploie 25 à 50 centigrammes de chloral pour 100 grammes d'eau. Au bout de trois quarts d'heure, la colonie est devenue insensible, ne réagit plus et peut être fixée. Foettinger a ainsi obtenu de bons résultats avec des Bryozoaires aquatiques et marins, des Annélides, des Mollusques, des Némertiens. Ces derniers deviennent insensibles sans avoir craché leur trompe. L'expérience n'a pas réussi avec les Hydroïdes. Les résultats obtenus avec les Actinies étaient assez satisfaisants. Des Astéracanthions ont pu être endormis.

Je sais que cette méthode donne souvent de bons résultats, mais elle ne réussit pas toujours. Je l'ai essayé avec des Némertiens, et je n'ai jamais eu le moindre succès.

Verworn (*Zeit. f. wiss. Zool.*, XLVI, 9, 1887, p. 99 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 148) s'en sert pour les Bryozoaires d'eau douce. Il laisse des colonies de *Cristatella* pendant quelques minutes dans une solution de chloral à 10 p. 100.

Kükenthal (*Jen. Zeit.*, XX, H. 4, 1887, p. 511 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 509) a obtenu de bons résultats avec quelques Anné-

Digitized by Google

lides au moyen d'une solution de chloral à 1 p. 1000 dans l'eau de mer.

Je pense que le chloral ne doit être employé qu'avec précaution, car il macère très vite. J'ai vu des animaux dont l'épiderme était très macéré avant que l'insensibilité fût établie.

22. Chlorure de magnésium (TULLBERG, *Arch. Zool. Expér. et Gén.*, X. 1892, p. 11). — Pour des Actinies, faire une solution à 33 p. 100 et l'ajouter graduellement à l'eau qui contient l'animal étalé, jusqu'à ce que cette eau contienne 1 p. 100 du sel. Ainsi pour 1 litre d'eau de mer ajoutez 33 cc. de la solution. Il faut une trentaine de minutes pour arriver à l'anesthésie. Pour des Invertébrés d'eau douce ou terrestres il faut prendre une solution un peu plus forte.

REDENBAUGH (*Amer. Nat.*, 1895, p. 399 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1895, p. 385) prend le sulfate de magnésie, qu'il emploie soit en solution, soit sous forme de cristaux.

23. Cocaïne (RICHARD, *Zool. Anzeig.*, 1885, p. 332). — Richard se sert d'une solution de chlorhydrate de cocaïne au centième. Les animaux à narcotiser (Bryozoaires) sont placés dans un verre de montre avec 5 cc. d'eau. On ajoute, peu à peu, de la solution de cocaïne. Après cinq minutes les animaux ne réagissent plus que faiblement ; on ajoute encore un demi-centimètre cube de la solution, et, un instant après, il faut exciter directement les tentacules, à l'aide d'une aiguille, assez fortement pour les voir se contracter. Dix minutes plus tard, les animaux doivent être morts épanouis, et peuvent alors être traités par les procédés ordinaires de fixation. Cette méthode convient pour les Bryozoaires, les Hydres et certains Vers.

24. Hydroxylamine. — HOFER (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1390, p. 318) a employé l'hydroxylamine avec succès pour les organismes les plus variés. On peut prendre ou bien le sulfate de la base ou bien l'hydrochlorate, ce dernier de préférence. L'hydrochlorate du commerce contient habituellement de l'acide chlorhydrique. Il faut le dissoudre dans de l'eau douce ou de l'eau de mer (pas dans de l'eau distillée), et neutraliser exactement par addition de carbonate de soude. On prend pour des Infusoires une solution d'une concentration de 0,1 p. 100 et on les y laisse trente minutes ; pour des hydres, 0.25 p. 100, et on les y laisse de quinze minutes à une heure ; pour *Hirudo*, 1 p. 100, 30 minutes à deux heures ; pour *Hélix* et *Anodonta*, même concentration, dix à vingt heures.

L'hydroxylamine est un agent réducteur très énergique. Les animaux paralysés ne doivent donc pas être tués par un agent fixateur facile à réduire, tel que l'acide osmique, l'acide chromique, le sublimé,

Digitized by Google

etc., à moins qu'il ne soit possible de les bien laver à l'eau auparavant.

25. Acide carbonique (Fol, *Zool. Anzeig.*, n° 128, 1885, p. 698. Aussi, *Bulletin de la Société Belge de Microscopie*, t. IV, 1882, p. 85). — Il faut saturer graduellement d'acide carbonique l'eau dans laquelle nage l'animal à immobiliser; celui-ci devient bientôt complètement insensible et immobile, tout en conservant son aspect naturel. Il reste sans changement pendant des heures et même des jours entiers; mais il reprend toute sa vivacité aussitôt que l'eau chargée d'acide carbonique est remplacée par de l'eau pure. Le procédé ne réussit ni avec les Poissons ni avec les Mollusques, mais il réussit avec la plupart des animaux dont le système nerveux conserve son caractère épiblastique, c'est-à-dire, par exemple, avec la plupart des Cœlentérés et des Echinodermes.

J'ai essayé cette méthode avec de petits Annelides et des Hirudinés, et j'ai eu des résultats excellents. Il n'est pas nécessaire d'employer un générateur pour fabriquer le gaz. Il suffit de prendre un siphon d'eau gazeuse du commerce, et d'en ajouter à l'eau qui contient les animaux.

26. Empoisonnement. — On obtient quelquefois de fort bons résultats en empoisonnant les animaux avec de petites doses d'un liquide fixateur. L'acide osmique et la liqueur de Kleinenberg s'emploient souvent à cet effet. Nous avons vu tuer des Méduses d'une manière très satisfaisante par le sublimé corrosif en nature, ajouté par pincées à l'eau contenant les Méduses. Voici une méthode pour conserver les Ascidies avec leurs orifices naturellement ouverts, due à Salvatore Lo Bianco, l'habile préparateur de la Station zoologique de Naples. On ajoute, peu à peu et très doucement, à l'eau qui contient les animaux, une solution d'acide chromique à 1 p. 100, additionnée d'acide acétique, en faisant en sorte que ce liquide nage à la surface de l'eau de mer et ne s'y mêle que lentement. Il faut quatre à cinq jours pour mener l'opération à bonne fin. (Garbini, *Manuale per la Technica Moderna del Microscopio*, p. 163.)

D'autres ajoutent à l'eau de mer des cristaux d'alun. On a aussi employé de cette manière la morphine, le curare, la strychnine, l'acide prussique et autres agents paralysants.

27. Asphyxie. — On sait que, pour faire mourir étendus les Gastéropodes pulmonés terrestres, il est d'usage de les mettre dans

Digitized by Google

un bocal rempli d'eau qui a été privée d'air par l'ébullition et hermétiquement clos. On trouve les animaux morts étendus après douze à vingt-quatre heures. Nous ajouterons qu'on nous a assuré que cet effet s'obtient plus promptement si l'on a soin d'ajouter à l'eau du bocal un peu de tabac.

Quelquefois on arrive au but simplement en laissant des animaux aquatiques épuiser d'eux-mêmes l'oxygène de l'eau dans laquelle on les a confinés. J'ai réussi ainsi avec des Holothuries et d'autres Échinodermes. Ward (*Amer. Nat.*, XXV, 1891, p. 398) a eu de bons résultats de cette manière avec des Hydraires, des Actinies, etc. Si les animaux se montrent imparfaitement étalés lorsque la narcose s'est établie, il faut les mettre pendant un instant dans de l'eau pure ; ils s'étendront, et à cet instant on les jette dans un liquide fixateur (Ward).

28. Autres procédés. — Certains Vers meurent lentement et étendus si on les met dans de l'eau chaude.

Le jus de citron m'a donné de bons résultats avec de petits Hirudinés qu'il fait mourir instantanément dans une attitude étalée.

L'eau douce sert quelquefois très bien pour étendre des animaux marins.

29. Pratique des fixations. — Les agents fixateurs s'emploient soit à l'état de liquides, soit à l'état de vapeurs. Nous ne connaissons que l'osmium qui soit généralement employé de cette dernière façon ; cependant l'alcool et l'acide sulfureux ont été récemment employés à l'état de vapeur avec fruit par Gilson et Carnoy, et nous ne serions nullement étonné de trouver que d'autres substances peuvent être utilisées avec avantage de cette façon (acide formique).

Pour fixer un objet avec la vapeur d'un de ces réactifs, on procède comme nous le disons au numéro 38.

Pour fixer un objet dans une solution quelconque, il va sans dire qu'on le plonge dans le liquide et qu'on l'y laisse jusqu'à ce que la réaction soit accomplie. Nous indiquons ici quelques précautions à prendre.

Il faut veiller avec soin à ce que les tissus, les éléments ou les organismes soient *parfaitement vivants* au moment de les fixer ; si on les laisse mourir avant de les exposer à l'action de l'agent fixateur, on ne fixe que des états pathologiques, ou des altérations *post mortem*.

Il faut veiller à ce que les objets à fixer soient aussi *petits* que

Digitized by Google

possible, pour que l'agent fixateur puisse les pénétrer rapidement et d'une façon égale. Des organes ou organismes entiers doivent être largement *ouverts*, si cela est possible.

On jettera les objets dans une quantité de solution fixatrice *très grande* par rapport au volume des objets ; il s'agit, en effet, d'empêcher que la composition de la solution fixatrice ne se trouve changée par l'addition des liquides ou des substances solubles des tissus.

En cas de nécessité, on facilitera l'action du fixateur en l'employant *à chaud*. La chaleur de l'étuve d'incubation sera souvent suffisante, mais quelquefois il faudra employer des liquides bouillants (sublimé bouillant pour quelques Coralliaires et Hydrozoaires, alcool absolu bouillant pour certains Arthropodes à téguments très imperméables).

Certains fixateurs demandent qu'on ne laisse les objets dans le liquide que *juste le temps nécessaire* pour que la fixation s'accomplisse, tel, par exemple, le sublimé corrosif; si on les y laisse séjourner trop longtemps, les tissus deviennent souvent cassants, et les colorations sont gênées. D'autres, au contraire, comme le liquide de Flemming, sont tels qu'on peut y laisser les objets pendant des jours ou des semaines sans inconvénient.

On aura soin de faire ensuite les *lavages* nécessaires pour enlever le réactif fixateur avec le *liquide approprié;* il n'est, par exemple, nullement indifférent de prendre l'eau ou l'alcool après tel ou tel réactif. Quelquefois l'eau défait toute l'œuvre de la fixation, quelquefois l'alcool donne lieu à des précipités qui ruinent les préparations. Nous tâcherons d'indiquer pour chaque cas le liquide de lavage qu'il convient d'employer.

Dans certains cas, on facilitera l'enlèvement de l'agent fixateur en faisant les *lavages à chaud*. L'acide picrique, par exemple, est presque deux fois aussi soluble dans l'alcool à la température de 40° qu'à la température ordinaire des appartements (Fol).

Les liquides soit de fixation, soit de lavage, doivent être *renouvelés* aussitôt qu'ils deviennent *troubles*.

Les objets une fois fixés et convenablement lavés peuvent être conservés indéfiniment dans de l'alcool (de 70 à 90 p. 100) ; mais il vaut toujours mieux les y laisser le moins longtemps possible.

En fait de considérations plus spéciales, nous ferons observer que : l'acide osmique est à éviter pour les structures peu perméables ; — l'acide picro-sulfurique est à éviter pour les structures qui contiennent une proportion notable de tissu conjonctif, vu qu'il fait gonfler ce tissu ; il est donc, en général, peu propre à l'étude des organes des Vertébrés.

Digitized by Google

Il faut éviter l'emploi d'instruments métalliques pour manier les objets qu'on a mis dans des solutions de sublimé corrosif, d'acide acétique ou de chlorure d'or, vu que les solutions de ces sels se précipitent au contact des métaux.

30. Fixation d'animaux marins. — On remarquera que les tissus des animaux marins sont en général plus réfractaires envers les agents chimiques que ceux des animaux terrestres ou d'eau douce des mêmes groupes. Il convient donc d'employer pour les animaux marins des solutions plus fortes (selon Langerhans, deux ou trois fois plus fortes que pour les animaux terrestres).

Outre cette précaution, il en est une autre, indiquée par Paul Mayer, qu'il est bon de ne pas perdre de vue. Ce naturaliste insiste avec raison sur la nécessité qu'il y a à débarrasser les animaux de leur eau de mer avant de les mettre dans de l'alcool ou dans un réactif qui soit capable de précipiter les sels contenus dans l'eau de mer. Si l'on néglige cette précaution, ces sels se précipitent autour de l'animal et à la surface de ses organes en une croûte qui forme un obstacle, beaucoup plus sérieux qu'on ne le croirait à première vue, à la pénétration d'abord de l'alcool lui-même, puis des solutions colorantes. Comme résultat, on a des macérations des tissus et des colorations défectueuses.

On évitera donc de se servir d'alcool pour la fixation des animaux marins ; on n'emploiera pas non plus, comme nous avons vu proposer de le faire, des solutions faites avec l'eau de mer comme menstrue ; mais on emploiera des solutions faites avec l'eau distillée, et de nature à maintenir en dissolution, et finalement à enlever, les sels dont nous parlons. Ces conditions se trouvent réalisées, par exemple, dans la liqueur de Kleinenberg et dans les liquides de Paul Mayer.

31. Choix d'un fixateur. — Tout agent fixateur devrait posséder les propriétés suivantes : tuer aussi rapidement que possible ; ne pas exercer sur les tissus d'action chimique nuisible ; causer le moins possible le ratatinement des tissus ; et ne pas avoir des effets qui puissent nuire aux opérations ultérieures, comme cela arrive par exemple lorsqu'on pratique la fixation avec des substances qui noircissent les tissus, ou les rendent cassants, ou bien qui les empêchent de donner les réactions voulues avec les solutions colorantes. Nous croyons qu'aucun des fixateurs connus n'est exempt de la totalité de ces défauts ; on en est réduit à choisir pour chaque cas particulier la

Digitized by Google

méthode dont les imperfections sont les moins gênantes pour le but que l'on se propose.

Les agents fixateurs sont, ou bien un agent physique — la chaleur — ou des substances qui, agissant apparemment d'une façon chimique, probablement en déshydratant les tissus, produisent une coagulation rapide de leurs principes constituants albuminoïdes, gélatineux ou muqueux. Au point de vue chimique, ces substances se trouvent être certains oxydes, des acides minéraux et organiques, certains sels des métaux lourds, certains chlorures, l'iode, l'alcool. Au point de vue pratique, il conviendra de grouper ces substances de diverses façons. S'agit-il d'obtenir une bonne fixation, ce sont l'acide osmique, l'acide chromique, et surtout les mélanges de ces deux substances, puis le chlorure d'or, qui tiennent le premier rang. S'agit-il, au contraire, d'une grande puissance de pénétration, telle que le demande la fixation des pièces très volumineuses, on préférera dans beaucoup de cas à tous ces réactifs un mélange picrique. S'agit-il enfin, comme c'est en général le cas, de pouvoir produire ensuite de belles colorations, sans trop de peine, par les méthodes ordinaires, on trouvera que ces réactifs se groupent à peu près comme suit (nous ne citons ici que les réactifs qui sont d'un emploi général) :

Fixateurs qui ne gênent pas les colorations.	*Fixateurs qui gênent les colorations.*
Chaleur.	Mélanges de Flemming.
Alcool.	Acide chromique.
Sublimé corrosif.	Chromate d'ammoniaque.
Acide nitrique.	Bichromate de potasse.
Nitrate d'argent en solution faible.	Nitrate d'argent en solution forte.
Osmium en vapeur.	Osmium en solution.
Acide picrique et mélanges picriques.	Chlorure de palladium.
Solution de Merkel.	Chlorure d'or.
Sels d'uranium.	

En donnant cette liste, nous ne voulons nullement donner à entendre que l'emploi des réactifs mentionnés dans la liste de droite porte atteinte à la *qualité* des colorations qu'on peut obtenir ensuite par les procédés ordinaires ; mais uniquement qu'ils les rendent tellement difficiles que l'opérateur se voit souvent obligé d'avoir recours à des colorants spéciaux autres que ceux qu'il aurait désiré employer s'il n'était pas ainsi limité dans son choix.

L'acide osmique est, de tous points, l'un des meilleurs fixateurs qui soient connus ; mais, outre qu'il a l'inconvénient de s'attacher obsti-

Digitized by Google

nément aux éléments des tissus d'où l'on ne peut le déloger que difficilement par des lavages répétés et où il a une grande tendance à se réduire et à noircir les préparations ; il a aussi le défaut d'avoir une très faible puissance de pénétration, ce qui fait qu'il ne convient en aucune façon pour des objets tant soit peu volumineux.

Dans bien des cas, il convient, pour des raisons de ce genre, de choisir un réactif qui n'a peut-être pas les éminentes qualités de fidélité de fixation que possèdent l'osmium et l'acide chromique, mais qui, en ne mettant pas d'obstacle aux opérations ultérieures, donne en définitive des préparations plus généralement utiles. Tels sont les mélanges picriques et l'acide nitrique, qui se laissent entièrement enlever des tissus par le lavage à l'alcool, et permettent d'obtenir facilement les colorations les plus précises; tel est le sublimé corrosif, qui, loin de gêner les colorations, les facilite dans la plupart des cas. L'alcool est un réactif des plus agréables à employer, et peut rendre des services dans des cas qui ne demandent pas une fidélité minutieuse de fixation. La solution de Merkel est un excellent réactif pour les pièces petites et délicates, mais son action est trop peu énergique pour que nous puissions la recommander pour le travail ordinaire. Les sels chromiques sont quelquefois excellents, et sont tout spécialement indiqués pour la préparation des centres nerveux des Vertébrés.

L'osmium en vapeur ne peut guère être employé que pour des structures membraneuses ou, du moins, très petites. La chaleur donne des résultats qui laissent un peu à désirer sous le rapport de la conservation des détails délicats ; on ne s'en sert donc qu'en cas de nécessité absolue.

On hésite à formuler des règles générales en une matière où il y a tant d'exceptions obligées. Nous dirons cependant qu'il y a deux de ces réactifs qui sont généralement employés et que nous recommandons tout spécialement pour les travaux ordinaires d'anatomie microscopique et d'embryologie : ce sont le *mélange de Flemming* et le *sublimé corrosif*. C'est bien le mélange de Flemming qui, en général, nous a donné de beaucoup les meilleurs résultats. Mais son emploi gêne à un certain degré les opérations ultérieures, et pour ce motif il nous semble que le sublimé conviendra souvent mieux à l'étudiant débutant. C'est un excellent réactif, presque, sinon tout à fait, de premier ordre, et c'est un de ceux qui gênent le moins les opérations ultérieures.

32. Durcissement. — Nous avons expliqué que dans la marche

Digitized by Google

normale de la préparation des objets pour l'inclusion dans la paraffine ou dans la celloïdine, ou pour le montage direct dans le baume, les pièces passent à travers des alcools successivement très forts, pour se trouver à la fin complètement déshydratés par l'alcool absolu. Dans la plupart des cas, ce traitement suffit pour communiquer aux tissus la consistance voulue pour les coupes ou pour les dissections. Mais il est des objets qu'il ne suffit pas de traiter selon cette méthode. Pour des objets très volumineux, tels que l'encéphale humain, ou les embryons humains de trois mois et plus, il ne saurait être question de fixation dans les règles. Ces objets n'arrivent en général entre les mains de l'anatomiste que plusieurs heures après la mort du sujet qui les fournit. Et d'ailleurs, des pièces aussi volumineuses ne se laissent pénétrer par aucun réactif avec une rapidité qui suffirait à assurer la fixation précise des éléments dans l'état où ils se trouvent pendant la vie. De plus, pour ces pièces très volumineuses nous sommes souvent forcés de renoncer à l'inclusion par infiltration ; on comprend facilement que l'encéphale humain ne saurait être infiltré de paraffine en un laps de temps raisonnable. Et même parmi les petits objets nous en trouvons qui n'acquièrent pas une bonne consistance pour les coupes par le simple passage à travers les alcools. Dans tous ces cas on a recours à l'action de réactifs durcissants.

33. Pratique des durcissements. — On prend pour règle générale de *commencer* toujours le durcissement *avec des réactifs dilués ;* on en augmente la concentration à mesure que les tissus se trouvent, par suite du durcissement qu'ils ont acquis, en état de supporter une action plus énergique.

Il importe beaucoup que le *volume du liquide* durcissant soit *considérable* relativement à celui de l'objet à durcir, ou du moins qu'il soit très fréquemment renouvelé. Car autrement, les substances des tissus, qui viennent à en sortir par diffusion, se mélangent au liquide durcissant, et, si celui-ci n'est pas en volume suffisant, en altèrent la composition à tel point qu'il n'agit plus de la manière voulue ; il peut même, en se chargeant de ces substances, exercer une action macérante, résultat directement opposé à ce que l'on désire réaliser par le durcissement. De plus, on observera qu'aussitôt que, en se chargeant de ces substances, le liquide extérieur est devenu d'une composition semblable, sous le rapport de la proportion de substances colloïdes et cristalloïdes qu'il contient, à celle du liquide qui baigne les tissus, la diffusion doit nécessairement cesser, l'équilibre osmotique étant établi ; et le liquide durcissant ne pénètre plus. D'autre part, il paraît

Digitized by Google

que la présence d'une faible proportion de colloïdes dans le liquide durcissant est favorable à la bonne consistance des tissus, en les empêchant de devenir friables. Il faut trouver par l'expérience les proportions qui conviennent pour chaque objet et pour chaque réactif ; tout ce que nous pouvons faire ici, c'est d'insister sur l'importance de l'emploi d'une quantité convenable de réactif.

Il est bon d'employer, pour les durcissements, des récipients cylindriques, et d'y *suspendre les objets* avec un fil, de telle sorte qu'ils se trouvent maintenus vers le haut du liquide. De cette façon, ils se trouvent entourés d'une atmosphère de liquide durcissant aussi pure que possible, les substances extraites des tissus s'y répandant par diffusion plus librement, et les précipités qui peuvent se former dans le liquide allant gagner le fond.

On veille avec soin à ce que l'action du réactif durcissant ne soit pas prolongée au delà du temps qui est strictement nécessaire pour donner aux tissus une consistance suffisante ; autrement les tissus deviennent friables, et les colorations deviennent de plus en plus difficiles.

34. Réactifs durcissants. — Ces réactifs sont en général essentiellement de même nature que ceux que nous employons pour la fixation ; seulement on les emploie pour le durcissement sous forme de solutions beaucoup plus étendues, et l'on met à profit surtout ceux d'entre les fixateurs dont l'action est la plus douce et la plus égale. Ce sont principalement l'acide chromique, puis les sels de chrome et des chlorures. On emploie en général l'acide chromique toutes les fois qu'on désire surtout arriver à un durcissement très rapide. Si au contraire on vise surtout la bonne consistance des pièces, on a recours à un sel de chrome. Nous donnons, dans la deuxième partie, des détails sur le durcissement des divers organes qui le demandent. C'est surtout le cas pour le *système nerveux central*. Les formules les plus usitées de réactifs durcissants, avec les explications voulues relatives à leur action sur les tissus et à la manière de s'en servir, se trouvent dans les paragraphes consacrés aux AGENTS FIXATEURS. Ces deux genres de réactifs étant, comme nous l'avons dit, essentiellement identiques, il n'y a pas d'inconvénient à les traiter ensemble. Nous éviterons aussi bien des redites. Et de cette façon, le chapitre spécial que, dans la première édition nous avions consacré à ce sujet sous le titre de RÉACTIFS DURCISSANTS ne nous sera plus nécessaire, son contenu ayant été distribué comme nous l'avons dit plus haut. *Le chapitre des* RÉACTIFS DURCISSANTS *est donc supprimé.*

Digitized by Google

CHAPITRE III

AGENTS FIXATEURS ET DURCISSANTS

ACIDES MINÉRAUX ET LEURS SELS

35. Tétroxyde d'osmium (acide osmique). — La substance connue dans les laboratoires sous le nom d'*acide osmique* n'est pas, strictement parlant, un acide, car elle ne contient pas de H, et ne rougit pas le papier de tournesol. C'est le tétroxyde d'osmium, $Os\,O^4$, seul composé un peu stable de ce métal, à ce que nous croyons. Elle est extrêmement volatile, et sa solution aqueuse se réduit avec une extrême facilité par le contact avec des substances organiques.

On croit généralement que la lumière seule suffit à réduire les solutions d'acide osmique. C'est là une erreur ; nous avons vu maintenir un flacon de cette solution pendant six mois exposé au soleil du Midi, sans qu'il se fût produit le moindre précipité. Mais le moindre grain de poussière organique suffit à déterminer la réduction.

On sait que les vapeurs osmiques ont une action très irritante sur les muqueuses ; elles provoquent facilement chez certains sujets de sérieux catarrhes, irritations des bronches, catarrhes laryngiens, conjonctivites, etc. Nous croyons qu'il y a un peu d'exagération dans ce qui a été dit à ce sujet, mais on fera bien de ne pas oublier que ces vapeurs possèdent certainement plus ou moins ces propriétés irritantes, et les personnes susceptibles devraient user de plus de précautions à cet égard que les autres.

36. Conservation des solutions osmiques. — Après avoir essayé bon nombre des méthodes qui ont été recommandées pour éviter la contamination des solutions par la poussière, je me suis arrêté à la pratique suivante :

Digitized by Google

Le tétroxyde dissous dans de l'eau additionnée d'acide chromique n'est plus facilement réductible par la poussière de l'air, comme l'est celui qui est dissous dans de l'eau pure, et l'on peut le conserver sans aucune précaution spéciale (si ce n'est qu'il faut naturellement employer, en vue de la grande volatilité de la solution, des flacons bien bouchés à l'émeri). Je conserve donc la majeure partie de ma provision *sous forme d'une solution à 2 p. 100 dans de la solution d'acide chromique à 1 p. 100*. Cette solution sert pour la fixation au moyen des vapeurs; elle sert aussi pour fabriquer la liqueur de Flemming qui est certainement le liquide osmique usuel le plus employé de beaucoup.

On peut aussi préparer une petite quantité de solution aqueuse à 1 p. 100 (ce qui permet de préparer facilement les solutions plus diluées et les mélanges, à mesure qu'on en a besoin), et la conserver avec le plus grand soin à l'abri de la poussière. Il est bon aussi d'avoir une petite provision de tétroxyde en nature; cela est commode pour les fixations par les vapeurs.

Il va sans dire qu'on ne doit jamais puiser dans les flacons avec une pipette.

Cori (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1890, p. 442) dit que les solutions dans l'eau distillée se conservent parfaitement bien, si l'on y ajoute assez de *permanganate de potasse* pour produire une légère teinte rosée, et si l'on a soin de renouveler de temps à autre l'addition de permanganate de manière à maintenir la teinte rosée.

Il sera peut-être utile de noter qu'on trouve maintenant chez les fournisseurs (du moins chez Grübler, à Leipzig) de l'acide osmique en tubes *à un dixième de gramme*, qui seraient certainement bien souvent beaucoup plus commodes que les anciens tubes à 1 gramme.

37. Régénération des solutions réduites. — On a proposé (Bristol, *Amer. Nat.*, XXVII, 1893, p. 175; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1893, p. 564; *Ref. Handbook Med. Sci. Supp.*, p. 442) de régénérer les solutions réduites en les oxydant par le peroxyde d'hydrogène. La réaction serait identique à celle qui a lieu lors du blanchiment des tissus par le peroxyde. Le tétroxyde d'osmium, OsO^4 est censé se réduire au contact de la matière organique en deutoxyde, OsO^2. Alors, $OsO^2 + 2H^2O^2 = OsO^4 + 2H^2O$. Bristol dit avoir trouvé que pour régénérer ainsi 100 cc. de solution à 1 p. 100 (erratum « 10 p. 100 » dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, *l. c.*) de tétroxyde d'osmium, il faut y ajouter 10 à 20 gouttes de peroxyde d'hydrogène frais. L'équation chimique de l'auteur paraît bien exacte, mais il ne me semble pas prouvé que cette réaction se réalise ainsi dans la pratique.

Kolossow (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 40) dit que les solutions à demi réduites, tant qu'elles n'ont pas perdu leur odeur caractéristique,

Digitized by Google

peuvent être régénérées par l'addition d'une petite quantité d'alun de potasse en poudre.

38. Fixation par les vapeurs osmiques. — C'est la fixation par les vapeurs osmiques qui est à la fois le procédé le plus commode et, en général, le plus efficace. Ainsi employé, l'acide osmique se montre beaucoup plus pénétrant, et donne des fixations beaucoup plus égales que quand on l'emploie en solution. Pour les cas où, comme pour les recherches sur les noyaux, on désire combiner l'action d'un acide organique avec celle du fixateur, il est facile d'employer les vapeurs dégagées d'un mélange d'acide osmique et d'acide formique ou d'acide acétique glacial (Gilson, *La Cellule*, I, 1885, p. 96). Les objets très petits (Infusoires, cellules isolées) peuvent être placés sur un porte-objets qu'on renverse au-dessus du goulot d'un flacon contenant l'acide osmique ou le mélange. Il suffit de quelques instants pour fixer de pareils objets. Des membranes ou des organes plus volumineux peuvent être fixés avec des épingles au fond d'un bouchon fermant le flacon qui contient le réactif. On les enlève aussitôt qu'ils commencent à brunir ; cependant, pour fixer des parties profondes, on peut prolonger la réaction pendant plusieurs heures. Il est bon de laver les pièces à l'eau avant de procéder à la coloration, mais ces lavages n'ont pas besoin d'être poussés aussi loin que pour les pièces fixées dans les solutions. Nous recommandons, comme colorants, le vert de méthyle pour les pièces destinées à être étudiées dans un milieu aqueux ; puis, pour les préparations au baume, le carmin à l'alun, le picro-carmin, ou l'hématoxyline préparée selon la formule que l'on préfère.

39. Fixation par les solutions osmiques. — Lorsqu'on se sert de l'acide osmique en solution, on emploie des concentrations variant de 0,05 à 2 p. 100, mais la tendance de la pratique récente paraît être d'employer des concentrations plus faibles. On prend, par exemple, pour les Infusoires, une solution de 0,5 p. 100, qu'on laisse agir pendant quelques secondes seulement ; pour les Porifères, 0,05 à 0,10 p. 100 pendant quelques heures ; pour les organes des Mollusques, 1 à 2 p. 100 jusqu'à vingt-quatre heures, selon le volume des pièces ; pour les épithéliums en général, 0,1 à 0,5 p. 100, pendant une heure (nous donnons des généralisations de la pratique telle que nous la trouvons rapportée dans la littérature ; — pour notre part, nous croyons que c'est là une fixation tout à fait exagérée) ; — pour les œufs méroblastiques, 0,1 p. 100, pendant vingt-quatre heures (nous pensons qu'ici il n'en faut pas moins) ; — pour

Digitized by Google

les tubes nerveux à myéline, 0,1 à 1 p. 100, pendant vingt minutes ou jusqu'à deux heures, selon les cas ; — pour les corpuscules tactiles, 0,33 à 1 p. 100, vingt-quatre heures ; — rétine, 0,25 à 2 p. 100, dix minutes à vingt-quatre heures (selon l'état de division des pièces, et les éléments qu'on désire étudier) ; — pour les noyaux en général, 0,1 à 2 p. 100, pendant deux ou trois heures (pour des cellules isolées, cela nous paraîtrait exagéré).

On peut additionner les solutions d'autres substances dans le but de les rendre plus pénétrantes. Ainsi on peut les mêler à l'alcool (RANVIER et VIGNAL). (RANVIER, *Leçons d'Anat. Gén.*, App. term. des muscles de la vie organique, p. 76. VIGNAL, *Archives de Physiol.*, 1884, p. 181). — On fait un mélange, à volumes égaux, d'acide osmique à 1 p. 100 et d'alcool à 90 p. 100. — On le laisse agir, pour des objets pas trop gros — des embryons de quelques millimètres — pendant une heure ou deux. On lave pendant quelques heures dans de l'alcool à 80 p. 100, pour que la réduction de l'osmium continue. Puis on peut laver à l'eau et colorer (quarante-huit heures) dans le picro-carmin ou l'hématoxyline. Cette méthode donne d'excellents résultats. Viallanes l'a appliquée avec fruit à l'histologie des Insectes.

KOLOSSOW (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, I, 1888, p. 51) recommande une solution de 0,5 p. 100 d'acide osmique dans une solution de nitrate ou d'acétate d'urane à 2 ou 3 p. 100, le nitrate étant à préférer. Cette méthode s'applique, dit-il, avec avantage aux imprégnations nerveuses.

MANN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, p. 481) recommande un mélange fraîchement préparé de volumes égaux d'acide osmique à 1 p. 100 et d'une solution saturée de sublimé corrosif dans de la solution physiologique de sel (pour centres nerveux).

Si la fixation demande une immersion prolongée, elle doit être pratiquée dans un récipient *bien clos*, et tenu à l'abri de la lumière.

L'osmium colore en un noir des plus intenses toutes les substances graisseuses ; il convient donc de s'en servir avec beaucoup de précaution dans la préparation de pièces qui contiennent beaucoup de tissu adipeux.

40. Traitement ultérieur. — Les pièces fixées dans les solutions osmiques doivent être très soigneusement lavées à l'eau. On peut prolonger les lavages aussi longtemps qu'on veut, l'eau n'étant nullement nuisible aux pièces ainsi fixées. On peut également employer la glycérine diluée. Nonobstant les soins les plus minutieux apportés au lavage, il n'arrive que trop souvent qu'il reste des traces de la solution osmique dans les tissus ; alors les préparations noirciront sûrement avec le temps. On peut plus ou moins prévenir ce noircissement en traitant les tissus avec des liquides légèrement alcalins. Schultze préconisait à cet effet l'acétate de potasse, qu'il employait

Digitized by Google

comme milieu conservateur ; nous croyons cependant que cette méthode n'est nullement infaillible. Fol recommande de laver avec une solution très faible de carbonate d'ammoniaque. La simple immersion, pendant le temps voulu par la coloration, dans du carmin à l'ammoniaque, ou même dans le picro-carmin, produit un effet semblable. Enfin, une méthode excellente est de mettre les pièces pendant vingt-quatre heures, ou plus, dans une solution de bichromate de potasse (soit dans la solution de Müller ou celle d'Erlicki), ou dans une solution faible (0,5 p. 100) d'acide chromique, ou dans la solution de Merkel, ou enfin dans une solution faible de ferrocyanure de potassium ou de cyanure de potassium. Le traitement par les solutions de bichromate a l'avantage de faciliter beaucoup la coloration par les carmins ou l'hématoxyline. Les pièces déjà noircies peuvent être décolorées par l'une ou l'autre des méthodes que nous exposons au chapitre traitant des procédés de Blanchiment, parmi lesquelles les procédés au peroxyde d'hydrogène seront des plus efficaces.

Overton (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, I, 1890) trouve que le blanchiment nécessaire peut s'effectuer en quelques minutes en un mélange d'une partie de peroxyde du commerce avec 10 à 25 parties d'alcool à 70 p. 100.

Nous recommandons les mêmes colorants que nous avons indiqués pour les objets fixés à la vapeur d'osmium. Pour les fixations légères, le carmin à l'alun est excellent ; mais pour les tissus un peu brunis il est souvent nécessaire d'avoir recours à un colorant plus énergique. En ce cas, on pourra employer avec avantage une coloration à l'hématéine (hématoxyline).

41. Acide chromique. Fixation. — L'anhydride chromique, CrO^3, se trouve dans le commerce sous forme de cristaux rouges qui se dissolvent dans l'eau en formant de l'acide chromique, H^2CrO^4. Ces cristaux étant extrêmement déliquescents, il est nécessaire de les conserver dans des flacons parfaitement bouchés à l'émeri. Il faut également avoir soin d'en tenir éloignées jusqu'aux moindres poussières organiques, le CrO^3 étant une substance qui se réduit très rapidement en sesquioxyde au contact des matières organiques. Nous recommandons d'en faire une solution à 1 p. 100, qui permet de préparer rapidement les mélanges et solutions plus *allongées* à mesure qu'on en a besoin.

Pour les *fixations*, on emploie en général des solutions de 0,1 p. 100, ou moins, jusqu'à 1 p. 100. On peut prolonger l'immersion

Digitized by Google

pendant plusieurs heures (objets embryologiques, quelques cellules). Les solutions très fortes, 2 à 5 p. 100, ne doivent agir que pendant très peu de temps. Pour les tissus nerveux, on prend des solutions très diluées, 0,02 à 0,125 p. 100, et on les laisse agir pendant plusieurs heures.

Pour le traitement ultérieur, voyez au numéro suivant.

Pour les *durcissements*, on emploie, en général, des solutions de 0,2 à 0,5 p. 100, dans l'eau. La durée de la réaction est de quelques jours à quelques semaines, selon la nature de l'objet. En général, on peut dire de l'acide chromique qu'il agit avec une très grande rapidité. Il permet d'obtenir en quelques jours un degré de durcissement qu'on n'obtiendrait pas en plusieurs semaines, par exemple, avec le bichromate de potasse. Les membranes muqueuses s'y durcissent d'une manière satisfaisante en deux ou trois jours, le cerveau en six semaines environ. D'après RANVIER, il faut prendre, pour des fragments de tissu de 1 centimètre de côté, 200 grammes de liquide. Cet auteur dit en outre qu'on ne doit jamais employer des fragments ayant plus de 3 centimètres de côté, si l'on veut obtenir les meilleurs résultats. Pour durcir une moelle épinière d'Homme, il faut prendre deux litres de liquide, et le renouveler au bout de quelques jours. Il faut six semaines à deux mois pour compléter le durcissement.

Ainsi que nous l'avons déjà dit, on commencera par des solutions très faibles, dont on augmentera graduellement la concentration, si cela est nécessaire ; et l'on veillera surtout à enlever les objets de la solution aussitôt qu'ils ont acquis une consistance suffisante. Cela est particulièrement important dans le cas de l'acide chromique, qui a le défaut de rendre les objets très cassants pour peu que son action soit prolongée. On doit les laver à l'eau, et les mettre pour la conservation dans l'alcool à 90 degrés. (Mais voyez à ce sujet le paragraphe suivant.)

L'acide chromique est un durcissant de premier ordre ; son grand défaut est la facilité avec laquelle il rend les tissus cassants.

Les solutions d'acide chromique ne sont pas très pénétrantes, il convient donc d'employer des objets aussi petits que possible. Et pour cette raison aussi, il conviendra le plus souvent de ne pas employer l'acide chromique pur, mais l'un des mélanges avec l'acide acétique, l'acide osmique, l'acide picrique, l'acide nitrique, que nous allons décrire plus bas.

C'est surtout sous forme de ces mélanges que l'acide chromique se montre comme étant un des fixateurs les plus fidèles que nous connaissions. Il a le grand défaut de gêner beaucoup les colorations. Ce défaut est moins sensible avec les mélanges qu'avec l'acide pur. Ces mélanges ont aussi l'avantage d'atténuer un autre défaut de ce réactif, défaut qui consiste en ce *qu'il précipite certains principes constituants, liquides, des tissus sous forme de filaments ou de réseaux*. Ces réseaux sont souvent d'une régularité remarquable, et ont été

Digitized by Google

plus d'une fois décrits comme étant des éléments histologiques normaux.

L'action de l'acide chromique sur les éléments des tissus est tout à fait particulière ; il ne les coagule pas simplement, mais forme avec certaines de leurs substances constituantes des combinaisons chimiques insolubles. C'est une sorte de tannage. On comprend donc l'impossibilité de l'éloigner entièrement par les lavages, et la difficulté qu'on éprouve à obtenir de bonnes colorations par les méthodes ordinaires.

42. Acide chromique. Traitement ultérieur. — On lave à l'eau, et avec grand soin. L'eau doit être souvent renouvelée. Il peut être bon de mettre les objets pendant vingt-quatre heures au-dessous d'un robinet. Des lavages même beaucoup plus prolongés ne nuisent pas aux objets fixés par l'acide chromique. Pendant l'été il peut être utile d'ajouter un antiseptique quelconque (un morceau de camphre ou un cristal de thymol) à l'eau, pour prévenir le développement d'Infusoires.

Au besoin, on peut également laver à l'alcool au tiers, et même avec des alcools plus forts. Nous n'admettons pas la nécessité absolue d'employer l'eau dans tous les cas.

Les meilleurs colorants sont l'hématoxyline et les anilines employées selon la méthode de Flemming.

Les objets qui ont été plongés pendant un certain temps dans les solutions d'acide chromique (ou des sels de cet acide) acquièrent une coloration vert brun, due à une réduction partielle de l'acide chromique dans les tissus. On peut faire disparaître cette coloration en traitant les pièces par le peroxyde d'hydrogène, qui leur rend la couleur jaune propre de l'acide chromique (UNNA, *Arch. f. mik. Anat.*, XXX, 1887, p. 47 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 1060). Le lecteur voudra bien comparer ce que nous avons dit de la décoloration des pièces osmiques, plus haut, n° 40.

42 *bis*. Action de la lumière sur l'alcool contenant des objets chromiques. — Lorsqu'on met dans l'alcool, pour la conservation ou pour le durcissement, des tissus qui ont été traités par l'acide chromique ou par un chromate, il se forme toujours, au bout de peu de temps, dans l'alcool un fin précipité qui se dépose à la surface des préparations et forme sans doute un obstacle plus ou moins grand à la pénétration de l'alcool. Le lavage préalable à l'eau n'empêche pas la formation de ce précipité ; et le renouvellement de l'alcool ne l'empêche pas de se reformer à plusieurs reprises. HANS VIRCHOW a trouvé (*Arch. f. mik. Anat.*, XXIV, 1885, p. 117) qu'on évite entièrement cette formation en prenant la précaution bien simple de maintenir les préparations dans l'obscurité. L'alcool s'y colore comme d'habitude en jaune, mais aucun précipité ne se forme. VIRCHOW

Digitized by Google

pense, d'après ses expériences, qu'en prenant cette précaution on peut sans inconvénient omettre, ou du moins abréger de beaucoup, le lavage à l'eau auquel on soumet habituellement les objets avant de les transporter dans l'alcool. Mais il ne faut pas pour cela négliger l'ancienne règle de renouveler l'alcool à mesure qu'il prend la coloration jaune.

43. Acide chromique et alcool (E. Klein, *Quart. Journ. Mic. Science*, 1879, p. 126-7). — A deux volumes de solution d'acide chromique à 1/6 p. 100, on ajoute 1 volume d'alcool ordinaire. Klein s'est beaucoup servi de ce mélange comme *fixateur* dans ses recherches cytologiques, et a trouvé qu'il donnait souvent de meilleurs résultats que les fixateurs ordinaires (y compris l'osmium). Colorer à l'hématoxyline.

Nous pensons qu'il peut y avoir souvent utilité d'ajouter de l'alcool aux solutions d'acide chromique, pour en augmenter la puissance de pénétration. Nous avons été un peu surpris en ne trouvant pas que de pareils mélanges aient été employés par aucun autre observateur que Klein.

44. Acide chromique et alcool (*Liquide de* Urban Pritchard). — Acide chromique, 1 partie; eau, 20 parties ; esprit-de-vin, 180 parties. — On fait dissoudre l'acide chromique dans l'eau, et on ajoute l'esprit-de-vin. (Si l'on ajoute directement l'alcool à l'acide chromique, il se produit une réaction d'une grande violence.) La solution prend bientôt une coloration brunâtre. Si, au bout de quelques jours, elle prend une consistance un peu gélatineuse, il faut la renouveler.

Ce liquide est particulièrement propre, selon Pritchard, au *durcissement* d'organes tels que la rétine, le limaçon. La durée de la réaction pour ces objets est de sept à dix jours. (Voyez *Quart. Journ. Mic. Science*, 1873, p. 427.)

45. Acide chromo-acétique (Flemming, *Zellsbz.*, *Kern.-u.-Zellth.*, p. 381). — Il est reconnu qu'il y a très souvent avantage à ajouter aux solutions d'acide chromique un peu d'acide acétique ou formique. Cela est favorable à la démonstration des éléments nucléaires en général, et surtout à la démonstration des figures achromatiques de la caryokinèse. Flemming recommande (surtout pour ce dernier objet) l'addition de environ 0,1 p. 100 d'acide acétique à une solution d'acide chromique de 0,2 à 0,25 p. 100. Colorer à l'hématoxyline. Ce mélange ne donne pas de préparations favorables pour la coloration avec la safranine ou d'autres couleurs d'aniline. (*Loc. cit.*, p. 382.)

Voici une formule due à Ehlers que je puis recommander comme excellente pour la conservation de beaucoup d'Annélides (vraisemblablement aussi pour d'autres organismes). — A 100 cc. d'acide chromique d'une concentration de 0,5 à 1 p. 100 on ajoute de 1 à 5 gouttes d'acide acétique cristallisable. La proportion indiquée d'acide acétique est suffisante pour neutraliser l'action ratatinante de l'acide chromique.

Digitized by Google

45 *bis*. Acide picro-chromique (Fol, *Lehrb.*, p. 100).

Acide picrique, sol. concentrée dans l'eau.	10	volumes.
Acide chromique à 1 p. 100.	25	—
Eau	65	—

Au moment de s'en servir, on peut ajouter environ 0,005 d'acide osmique, ce qui en rend l'action plus énergique. Laver légèrement à l'eau (qu'il vaut mieux prendre chaude, presque bouillante), puis à fond avec de l'alcool.

Fol dit, *loc. cit.* : « Ce réactif durcit les tissus d'une manière admirable, sans gêner en aucune façon les colorations; mais il a peu de puissance de pénétration et fixe lentement, et pour cela ne peut être recommandé que pour des objets peu volumineux. »

Il me semble que ce liquide pénètre mieux que ne le pensait Fol. Il donne de très bons résultats avec des Annélides, et peut rendre de bons services pour des objets destinés à être montés en entier.

Ce liquide, avec l'addition d'un peu d'acide acétique, a été cité comme « liquide de Haensel », je ne sais pas de quel droit.

46. Acide chromo-formique (Rabl, *Morphol. Jahrb.*, X Bd., 1884, p. 215-6). — A 200 grammes d'une solution d'acide chromique de 0,33 p. 100, ajoutez 4 ou 5 gouttes d'acide formique concentré. Le mélange doit être fraichement préparé au moment de s'en servir. Fixer pendant douze à vingt-quatre heures, laver à l'eau, durcir ensuite graduellement dans l'alcool. Colorer à l'hématoxyline ou à la safranine.

47. Mélange chromo-osmique (Max Flesch, *Arch. f. mik. Anat.*, XVI, 1878, p. 300). — En combinant les solutions d'osmium et d'acide chromique, on produit un mélange qui est *stable* (ne se réduisant pas facilement), qui fixe en général mieux que l'une ou l'autre de ces solutions employée seule, et qui permet d'y laisser des tissus pendant vingt-quatre à trente-six heures *sans qu'ils se noircissent* par l'osmium d'une manière excessive. Ce mélange a aussi l'avantage d'être d'une utilité très générale ; il peut être employé avec toutes sortes d'objets. On remarquera qu'il permet de combiner d'une manière utile l'action foudroyante de l'osmium avec l'action durcissante plus lente, mais plus égale, et pour cela peut-être plus fidèle, de l'acide chromique.

Max Flesch recommande un liquide composé de 0,1 partie d'acide osmique et 0,25 partie d'acide chromique pour 100 parties d'eau.

48. Mélange chromo-acéto-osmique. *Liquide de* Flemming *Ancienne formule, mélange faible* (*Zellsubstanz.*, *Kern-u.-Zellthei-*

Digitized by Google

lung, 1882, p. 381). — A la suite d'une étude approfondie des propriétés du mélange de Max Flesch, Flemming trouva qu'il était susceptible d'amélioration, surtout pour les études cytologiques. Il reconnut que l'addition d'un peu d'acide acétique ou formique a pour effet non seulement de mieux différencier les éléments achromatiques des noyaux, mais, ce qui est encore plus important, de favoriser beaucoup les colorations avec l'hématoxyline, les carmins, ou les couleurs d'aniline. Il recommande donc d'ajouter au mélange de Max Flesch 0,1 p. 100 d'acide acétique glacial, soit la formule :

Acide chromique	0,25 p. 100	dans l'eau[1].
Acide osmique	0,1 —	
Acide acétique glacial	0,1 —	

Flemming fait observer qu'il obtient les meilleurs résultats, comme fidélité de fixation des éléments cellulaires, avec des immersions de peu de durée, une demi-heure au maximum. Il lave à l'eau, et colore à l'hématoxyline ou avec une couleur d'aniline. Je suis cependant bien convaincu que très souvent on obtient des résultats meilleurs avec des fixations beaucoup plus prolongées, jusqu'à vingt-quatre ou quarante-huit heures ou plus.

Il n'est pas nécessaire de s'en tenir toujours aux proportions exactes de la formule que nous venons de donner ; ainsi Fol (*Lehrb. d. vergl. mik. Anat.*, 1884, p. 100) conseille un mélange beaucoup plus faible en osmium que celui de Flemming. Il prend.

Acide chromique à 1 p. 100.	25 volumes.
Acide osmique à 1 p. 100.	2 —
Acide acétique à 2 p. 100.	5 —
Eau.	68 —

Soit en centièmes :

Acide chromique	0,25 p. 100	dans l'eau.
Acide osmique.	0,02 —	
Acide acétique.	0,1 —	

[1] Pour fabriquer ce mélange avec les solutions normales, on n'a qu'à prendre :

Acide chromique à 1 p. 100.	25 volumes.
Acide osmique à 1 p. 100.	10 —
Acide acétique à 1 p. 100.	10 —
Eau.	55 —

Si l'on conserve sa provision d'acide osmique sous forme d'une solution à 2 p. 100 dans de l'acide chromique à 1 p. 100, comme j'ai conseillé de le faire plus haut (§ 36), il faut prendre seulement 20 volumes d'acide chromique, 5 de la solution d'acide osmique, et 65 d'eau.

Digitized by Google

Et Cori (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, I, 1890, p. 441) a préconisé un mélange contenant seulement 1 volume de solution d'acide osmique, au lieu de 2.

Dans la dernière édition nous avons dit qu'à la suite d'expériences comparatives avec la formule de Flemming et celle de Fol, nous avions trouvé que cette dernière nous avait donné les meilleurs résultats, tant pour les tissus des Vertébrés que pour ceux des Arthropodes. Nous avons trouvé la fixation tout aussi bonne, ou meilleure; les pièces brunissaient beaucoup moins qu'avec le mélange de Flemming; les lavages étaient plus faciles; et nos pièces présentaient une consistance plus favorable pour les coupes. De plus, les colorations se faisaient bien plus facilement. Je dois dire maintenant que, pour ma part, après une expérience plus étendue, j'ai dû modifier ma manière de voir cet égard. Les mélanges plus faibles ont bien l'avantage de faciliter les colorations par les carmins, etc.; mais comme *fidélité de fixation* je les trouve en général inférieurs aux mélanges plus forts, et je pense que *le « Liquide fort » de Flemming dont nous allons parler dans le paragraphe suivant constitue en général un progrès.*

La modification de von Bungner (voy. *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 392) consiste à doubler la dose d'acide acétique recommandée par Flemming. Il me semble au contraire qu'il y aurait plus souvent utilité à la diminuer.

On peut laisser les tissus des jours entiers, voire même des semaines ou des mois, dans l'un ou l'autre de ces mélanges, sans crainte de les voir s'altérer d'une manière notable. Mais plus on prolonge l'immersion, et plus les colorations ordinaires deviennent difficiles; de sorte que les couleurs d'aniline sont presque le complément obligé des fixations prolongées. La pratique ordinaire est de laver longuement à l'eau (ou mieux, dans de l'eau courante; — on peut laisser dégorger les pièces pendant une heure ou plusieurs sous un robinet d'eau ordinaire), et de colorer à l'hématoxyline ou avec une couleur d'aniline. Les pièces bien lavées peuvent être colorées par les moyens ordinaires. Nous employons par exemple souvent le carmin à l'alun (étendu, avec une trace d'osmium), réactif peu énergique, mais que nous estimons être le plus fidèle de tous les carmins. Nous employons aussi avec un parfait succès le carmin au borax.

Les mélanges chromo-acéto-osmiques prennent certainement rang parmi les meilleurs fixateurs qui aient été imaginés.

Plusieurs auteurs ont formulé des critiques à propos de la fidélité de fixation du liquide de Flemming (voyez, par exemple, Faussek, *Zeit. f. wiss.*

Digitized by Google

Zool., XLV, 1887, p. 694 ; ARNOLD, *Arch. f. mik. Anat.*, XXX, 1887, p. 205 ; A. KOTLAREWSKY, *Mitth. d. Naturf. Ges. Bern.*, 1887 ou *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 387). Je pense que ces critiques sont trop généralisées. Il va sans dire qu'il n'y a pas de réactif universel, et que le liquide de FLEMMING ne donnera pas de bons résultats si on l'emploie avec des objets auxquels il n'est pas adapté. Mais à cela près j'estime qu'il est de toute confiance. Son plus grand défaut, c'est d'être très peu pénétrant ; il n'agit parfaitement qu'à travers une très faible épaisseur de tissu.

49. Mélange chromo-acéto-osmique de Flemming, *nouvelle formule*, ou « **mélange fort** ». (FLEMMING, *Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie*, I, 1884, p. 349.)

Acide chromique à 1 p. 100	15 parties.
Acide osmique à 2 p. 100	4 —
Acide acétique cristallisable	1 —

Si vous n'avez pas sous la main de la solution d'acide osmique à 2 p. 100, vous pouvez prendre :

Acide chromique à 10 p. 100.	15 parties.
Acide osmique à 1 p. 100	80 —
Acide acétique cristallisable	10 —
Eau	95 —

Ce liquide se détériore par réduction de l'acide osmique beaucoup plus facilement que ne le fait le « mélange faible », ce qui est vraisemblablement un effet de la plus forte proportion d'acide organique qu'il contient. En conséquence, je recommande la pratique suivante, dont je me suis toujours bien trouvé. On fait et l'on conserve à part.

(A) Une solution contenant

Acide chromique à 1 p. 100	11 parties.
Eau	4 —
Acide acétique	1 —

et (B) une solution d'acide osmique à 2 p. 100 dans de l'acide chromique à 1 p. 100. Pour faire le liquide définitif à mesure qu'on en a besoin, on n'a qu'à mêler quatre parties de A avec une partie de B. Ou si on le préfère, on peut se faire une provision d'acide osmique et acide chromique dans les proportions indiquées par Flemming, et y ajouter 5 p. 100 d'acide acétique au moment de s'en servir.

MERK (*Denkschr. d. Math. Naturw. Cl. d. K. Acad. d. Wiss. Wien.*, 1887 ; cf. *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 2, 1888, p. 237) a proposé de faire à part une solution de :

Acide chromique à 2 p. 100.	7,5 parties.
Eau	3,5 —
Acide acétique	1 —

Digitized by Google

et d'en combiner 12 parties avec 8 parties d'acide osmique à 1 p. 100 au moment de s'en servir. Cette pratique me paraît inférieure à la mienne en ce qu'elle n'éloigne pas la difficulté connue qu'il y a à conserver l'acide osmique en solution dans l'eau pure.

Dans tous les cas, il est bon de ne pas préparer de grandes provisions du mélange à la fois, pour un autre motif. C'est que, l'acide osmique étant extrêmement volatil, les solutions qui ont servi pendant longtemps ne contiennent plus la proportion de cet ingrédient, qui est nécessaire pour balancer l'action gonflante de l'acide acétique. Si l'on est obligé d'employer de vieilles solutions, il convient d'y ajouter un peu d'acide osmique.

Comme pour le « Mélange faible », il n'est pas nécessaire dans tous les cas de s'en tenir rigoureusement aux proportions indiquées. Ainsi CARNOY (*La Cellule*, I, 2, 1885, p. 211) a employé avec avantage un mélange d'un tiers plus fort en acide osmique et deux fois plus fort en acide chromique, à savoir :

Acide chromique à 2 p. 100 (ou plus)	45 parties.
Acide osmique à 2 p. 100.	16 —
Acide acétique cristallisable.	3 —

PODWYSSOZKI (ZIEGLER'S *Beitraege z. path. Anat.*, I, 1886 ; cf. *Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 3, 1886, p. 405) a recommandé (surtout pour des glandes) de dissoudre l'acide chromique dans de la solution de sublimé corrosif à 0,5 p. 100 dans l'eau, et de ne prendre que 6 à 8 gouttes d'acide acétique pour 19 cc. du mélange, la proportion d'acide osmique demeurant comme dans la formule de Flemming. Le sublimé est ajouté pour augmenter la puissance de pénétration du mélange (mais cette addition est nuisible, dit-il, à la coloration des pièces).

Comme pour le « mélange faible », on lave longuement à l'eau (et même, encore plus longtemps) et l'on colore à l'hématoxyline ou, s'il s'agit de coupes, par une couleur d'aniline. On peut sans inconvénient soumettre les pièces à une fixation très prolongée, vingt-quatre heures ou plus ; mais pour le travail ordinaire une demi-heure suffira. Quelques auteurs recommandent même de laisser les pièces à l'occasion pendant des semaines entières dans le liquide.

En d'autres termes, le liquide de Flemming peut servir, soit pur, soit *allongé d'eau*, pour les *durcissements* aussi bien que pour les *fixations* proprement dites. Mais le plus souvent il suffira de peu de temps, le temps voulu pour assurer la pénétration et un peu plus. Il ne faut pas craindre de prolonger les lavages à l'eau ; la plupart des tissus peuvent y rester pendant des journées sans inconvénient.

Le « mélange fort » ne brunit pas les tissus plus que le « mélange faible », même plutôt moins.

Digitized by Google

Le tissu adipeux se noircit par l'un ou l'autre de ces liquides. On peut faire disparaître des tissus la graisse noircie en les traitant pendant quelques heures (après déshydratation par l'alcool) avec de l'essence de térébenthine qui a été préalablement exposée au soleil pendant une heure ou deux. (FLEMMING, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, I, 1889, p. 39, et VI, 2, 1889, p. 178.)

Le « mélange fort » fut imaginé en premier lieu dans le but très spécial de faciliter les recherches ayant pour objet de constater la présence de mitoses dans les tissus (et non d'étudier la structure intime de ces figures, ni pour servir aux recherches générales d'histologie), mais il s'est trouvé par la suite être en même temps admirable pour les travaux ordinaires. La plupart des auteurs l'emploient maintenant de préférence au « mélange faible ». J'ajouterai que dans mon expérience personnelle c'est celui de tous les fixateurs qui m'a rendu les plus grands services. Je pense bien que *dans la plupart des cas* il est supérieur au « mélange faible ».

50. Acide nitrique (ALTMANN, *Arch. Anat. u. Phys.*, 1881, p. 219). — Altmann se sert d'une solution aqueuse titrée à environ 3 à 3,5 p. 100 d'acide pur. Une solution de cette concentration possède une densité de 1,02 environ, ce qui permet de titrer les solutions d'une façon aussi commode qu'exacte en se servant d'un aréomètre. (Une densité de 1,0201 correspond exactement à 3° de l'échelle de Baumé; le titrage est donc des plus simples.) On peut se servir de solutions plus concentrées, mais elles ne donnent pas de résultats définitifs aussi bons.

On lave à l'alcool, et l'on peut colorer avec n'importe quelle teinture.

Les solutions plus concentrées d'acide nitrique ont été l'objet d'études sérieuses. USKOFF recommande pour des objets embryologiques une solution de 5 p. 100, qu'il laisse agir pendant dix à trente minutes. WOLFF a employé avec de bons résultats une concentration de 10 p. 100 (œuf de la Poule).

Pour des préparations extemporanées de l'œuf des Astérides, FLEMMING a obtenu de bons résultats avec une solution de 40 p. 100. His aussi a recommandé une solution de 10 p. 100. ALTMANN a essayé cette concentration, et a trouvé qu'elle ne permettait pas de démontrer les figures nucléaires. Il pense que les solutions concentrées coagulent trop fortement les albuminoïdes solubles des tissus, ce qui a pour effet de nuire à la différenciation optique des structures.

Pour les lavages, on peut prendre, au lieu d'alcool, une solution aqueuse d'alun de 1 à 2 p. 100 (Uskoff, Rabl.).

On peut aussi employer l'alcool pour préparer le liquide fixateur. On mélange à cet effet 3 volumes d'acide nitrique avec 97 volumes d'alcool à 70 p. 100. (FOL; inédit. Nous devons cette indication à l'obligeance de M. le professeur Fol.)

J'ai essayé consciencieusement l'acide nitrique d'Altmann, et je l'ai abandonné parce que je l'ai trouvé être un fixateur décidément trop peu énergique.

Pour les *durcissements* on l'emploie quelquefois à une concentration de

Digitized by Google

3 à 10 p. 100. On le laisse agir pendant deux ou trois semaines. Employé de cette manière (10 à 12 p. 100), il fournit des préparations de l'encéphale qui sont en même temps très dures et flexibles.

BENDA (*Verh. anat. Ges. Wurzburg*, 1888; *Ergeb. der Anat.*, I, 1891, p. 7) fixe pendant vingt-quatre à quarante-huit heures dans de l'acide nitrique à 10 p. 100, puis porte les pièces, sans lavage préalable, dans une solution saturée de bichromate de potasse allongée de 3 volumes d'eau. On augmente graduellement la concentration du bichromate, de manière à arriver en deux ou trois jours (ou jusqu'à quatorze jours pour l'encéphale et la moelle épinière) à une concentration de 1 volume de la solution de bichromate pour un volume d'eau. Il est dit que ce procédé peut s'appliquer à des pièces assez volumineuses (testicule entier de l'Homme, etc.), et qu'il leur donne une consistance extrêmement dure.

51. Acide chromo-nitrique (*Liquide de* PERENYI; *Zoologischer Anzeiger*, V, 1882, p. 459).

Acide chromique à 0,5 p. 100	3 parties.
Acide nitrique à 10 p. 100.	4 —
Alcool.	3 —

On mêle ces liquides, et au bout de peu de temps on obtient une solution d'un beau violet.

On y laisse les objets (du moins si ce sont des œufs) pendant quatre à cinq heures; on les met ensuite pendant vingt-quatre heures dans de l'alcool à 70 degrés, puis pendant quelques jours dans de l'alcool fort; et finalement pendant quatre à cinq jours dans de l'alcool absolu. Au bout de ce temps, ils ont acquis la meilleure consistance pour être coupés au microtome. Des œufs ainsi préparés se coupent comme du cartilage; ils ne sont pas le moins du monde poreux, et les blastomères et leurs noyaux se trouvent parfaitement bien conservés.

J'ai employé le liquide de Perenyi avec des objets très variés (mais surtout des animaux marins), et je l'ai toujours trouvé excellent. Il fixe assez rapidement, de sorte qu'il est rarement nécessaire d'y laisser les objets aussi longtemps que le dit Perenyi pour les œufs. Et il n'est pas nécessaire en général de les durcir longuement dans l'alcool; un simple passage à travers les alcools usuels suffit le plus souvent. Dans les fixateurs plutôt doux, c'est *un des meilleurs que j'aie essayés.*

PERENYI a donné plus tard une formule modifiée, pour la fixation d'embryons de *Lacerta*. Nous la donnerons dans les « Méthodes embryologiques ».

Les instructions que donne Perenyi pour l'emploi des matières colorantes dissoutes dans le liquide fixateur me paraissent peu rationnelles, et je les supprime.

Digitized by Google

52. Acide chromo-nitrique avec bichromate de potasse (Kollmann). — Voyez aux *Méthodes embryologiques.*

53. Mélange chromo-platinique (*Solution de* Merkel ; Merkel, *Ueber die Macula lutea*, etc., 1870, p. 19 ; — *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 2, 1881, p. 11). — Ce mélange se compose de volumes égaux d'acide chromique à 1/400 et de chlorure de platine ($Pt\ Cl^4$) à 1/400, soit :

Acide chromique à 1 p. 100.		volume.
Chlorure de platine à 1 p. 100	1	—
Eau	6	—

Ce mélange ne pénètre pas avec une très grande rapidité, mais, comme il a une action très douce, on peut y laisser les objets très longtemps. Merkel y laissait des portions de rétine pendant trois ou quatre jours; Eisig y laisse des Annélides pendant trois à cinq heures; Whitman trouve que pour de petites Sangsues il suffit d'une heure.

On lave à l'alcool. Eisig prend l'alcool à 70 degrés; Whitman celui à 50 degrés. Outre son action très douce, qui fait que cette solution est particulièrement propre à la fixation d'objets délicats, elle a le grand avantage de ne pas gêner les colorations avec les teintures ordinaires, nonobstant la présence de l'acide chromique. Elle rend des services en prévenant le noircissement d'objets qui ont été fixés dans l'osmium (à cette fin, il convient de les laisser plusieurs heures dans la solution).

Durcissement. — Des tissus peuvent rester assez longtemps dans ce liquide pour que nous ayons à le citer parmi les réactifs durcissants. Whitman prend, pour le durcissement des œufs pélagiques de Poissons, un mélange plus fort en acide chromique, dû à Eisig, à ce que nous croyons, à savoir : chlorure de platine, 0,25 p. 100, 1 volume ; et acide chromique, 1 p. 100, 1 volume. Les œufs y restent un ou deux jours.

La solution de Merkel est *très recommandable* à cause de son action excellente, et parce qu'elle permet d'obtenir de très belles colorations par les procédés ordinaires de teinture progressive.

SELS CHROMIQUES

54. Bichromate de potasse. — Le bichromate de potasse est peu employé *seul*, comme *fixateur*. Il a le défaut de pénétrer très lentement et de ne pas conserver les noyaux d'une manière fidèle, mais il est peut-être le plus important de tous les agents *durcissants*

Digitized by Google

proprement dits. Ce sel se trouve dans le commerce sous forme de beaux cristaux de couleur orange, parfaitement stables. Il est très soluble dans l'eau, mais les solutions ne sont pas parfaitement stables, et (comme celles de l'acide chromique) se détruisent plus ou moins à la lumière et se laissent envahir par des moisissures. Il est donc bon de les tenir dans l'obscurité et d'y ajouter quelques morceaux de camphre.

On prend pour les durcissements des solutions de 2 à 5 p. 100. Comme pour l'acide chromique, il est urgent d'employer d'abord les concentrations faibles, et de passer graduellement aux plus fortes. Il est également important que la quantité de la solution soit très abondante. Le durcissement est extrêmement lent ; il faut des semaines pour arriver au degré de consistance qu'on obtient en quelques jours avec l'acide chromique. Mais la consistance qu'on obtient est irréprochable, et le procédé a sur celui de l'acide chromique le grand avantage qu'il n'est pas nécessaire de guetter aussi minutieusement le moment où il faut faire cesser la réaction. Les pièces peuvent rester presque indéfiniment dans les solutions sans devenir friables. Nous avons trouvé qu'il faut environ trois semaines pour durcir un œil de Mouton dans des solutions graduellement augmentées de concentration de 2 à 4 p. 100. Pour durcir une moelle d'Homme, il faut trois à six semaines ; pour un cerveau, au moins autant de mois.

A la sortie de la solution, il est urgent de laver les pièces à fond dans l'eau avant de les mettre dans l'alcool. Si l'on néglige cette précaution il se forme un précipité finement granuleux, qui s'attache aux tissus, et dont il est très difficile de se débarrasser en renouvelant l'alcool. (Mais voyez plus haut, § 42.) *Si l'on veut avoir de belles colorations au carmin, surtout au carmin à l'ammoniaque, qui est si excellent pour le système nerveux central, il ne faut pas mettre les tissus dans l'alcool ; il faut même éviter avec un soin minutieux tout contact des tissus avec l'alcool.* A part cela, on peut les conserver dans l'alcool (de 70 à 90 degrés) jusqu'à ce qu'on désire les utiliser.

On peut colorer au carmin ou à l'hématoxyline.

Le traitement par le bichromate communique aux tissus une couleur de rouille qui est très désagréable à l'œil et dont il est impossible de les débarrasser par le lavage à l'eau. On a dit que les pièces peuvent être décolorées par le lavage, pendant quelques minutes, dans une solution à 1 p. 100 d'hydrate de chloral. Nous ne savons à qui cette recommandation est due. Gierke dit que le traitement par

Digitized by Google

le chloral empêche la conservation des préparations. On peut les décolorer très rapidement par l'addition de quelques gouttes de solution alcoolique d'anhydride sulfureux SO^2 (GILSON, in litt.). Voyez au demeurant ce que nous avons dit à ce sujet plus haut, numéro 42.

55. Bichromate et sulfate de cuivre. — Liquide de KULTSCHITZKY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 348). Solution saturée de bichromate de potasse et sulfate de cuivre dans de l'alcool à 50 p. 100 à laquelle on ajoute au moment de s'en servir un peu d'acide acétique, soit 5 ou 6 gouttes pour 100 cc.

Pour préparer la solution, ajoutez les deux sels en excès à l'alcool, et laissez le tout pendant vingt-quatre heures *dans l'obscurité absolue.*

Fixer pendant douze à vingt-quatre heures, également *dans l'obscurité* (sans cela les sels se précipiteraient). Lavez à l'alcool fort pendant douze à vingt-quatre heures.

Kultschitzky explique que ce mélange fixe fidèlement l'élément plasmatique des tissus sans provoquer les précipités réticulés des albuminoïdes qu'y produit si souvent l'acide chromique (plus haut, n° 41). Ce serait là le rôle des deux sels. La chromatine des noyaux serait également fixée fidèlement par l'acide organique.

J'ai des doutes sur l'exactitude de cette manière de voir. Le sulfate de cuivre n'est pas ce qu'il y a de meilleur pour les noyaux. S'il ne dissout pas la chromatine, comme le croyait SCHWARTZ, du moins il la prive plus ou moins de son affinité pour les matières colorantes (HALLIBURTON).

56. Liquide de Müller.

Bichromate de potasse	2 à 2 1/2	parties.
Sulfate de soude	1	—
Eau	100	—

Pour les *durcissements* seulement. S'emploie de la même manière que la solution simple de bichromate. Ce liquide fut recommandé par Müller pour le durcissement de la rétine, et, pour cet objet et d'autres semblables, a joui pendant longtemps d'une grande vogue dans les laboratoires. Nous avouons que nous ne nous rendons pas bien compte du rôle que peut jouer le sel de soude dans ce mélange (à moins qu'il ne serve à y provoquer la formation d'un peu d'acide chromique libre ?) et que nous n'avons pas pu nous apercevoir que ce mélange donnât des résultats sensiblement différents de ceux du bichromate pur. FLEMMING a trouvé que son action sur les noyaux est identique à celui du bichromate pur. FOL dit que pour les embryons, pour lesquels on l'a beaucoup préconisé, il est absolument sans valeur.

ZENKER a recommandé d'additionner ce liquide de sublimé et d'acide acétique, voy. numéro 68 *bis*.

Digitized by Google

57. Liquide d'Erlicki (*Warschauer Med. Zeit.*, XXIII, nos 15 et 18).

Bichromate de potasse	2,5	parties.
Sulfate de cuivre.	1,0	—
Eau.	100,0	—

Pour les *durcissements* seulement.

On comprend facilement l'utilité de l'addition du sulfate de cuivre au bichromate de potasse. Ce sulfate est lui-même un durcissant énergique, et sert ici à renforcer l'action un peu trop lente du bichromate ; et effectivement le liquide d'Erlicki *durcit incomparablement plus vite* que celui de Müller ou que le bichromate simple. Avec ce mélange on peut durcir la moelle en quatre jours à la température d'un incubateur, en dix jours à la température normale (Fol). Cette formule est très usitée en Allemagne, et nous croyons qu'elle constitue l'un des meilleurs durcissants qui soient connus pour les objets volumineux. Nous l'avons vu largement employer au laboratoire de morphologie de l'Université de Genève pour les embryons humains âgés de plusieurs mois.

On observe souvent, dans des portions des centres nerveux qui ont été durcis par le liquide d'Erlicki, des taches foncées, avec des prolongements, qui simulent des cellules ganglionnaires. On les a considérées comme des productions pathologiques, mais il est maintenant démontré que ce ne sont que des dépôts formés par l'action du liquide durcissant. On peut les faire disparaître par l'eau chaude, ou mieux par l'eau légèrement acidulée par l'HCl, ou bien en traitant les pièces par l'acide chromique à 0,5 p. 100 avant de les mettre dans l'alcool. (Edinger, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 245 ; Lœwental, *Rev. méd. de la Suisse romande*, 6e année, I, p. 20.)

58. Bichromate et chlorure de platine (Lindsay Johnson, *in litt.*).

Bichromate de potasse à 2,5 p. 100.	70	parties.
Acide osmique à 2 p. 100.	10	—
Chlorure de platine à 1 p. 100	15	—
Acide acétique ou formique	5	—

Ce mélange fut imaginé pour le durcissement préliminaire, après fixation, de la rétine, sur laquelle l'auteur le laissait agir pendant douze heures, puis achevait le durcissement dans du bichromate pur. M. Lindsay Johnson m'écrit que la présence de l'acide osmique sert à abréger beaucoup la durée du durcissement ; en trois jours on peut mener une rétine à travers toutes les étapes usuelles jusque dans la celloïdine. Si l'on voit que la préparation tend à se noircir, on peut prévenir cela en ajoutant 10 parties de solution

Digitized by Google

de nitrate d'urane à 5 p. 100, qui forme une couche d'urane de couleur brune au-dessus de l'osmium réduit. L. Johnson a maintenant trouvé qu'au lieu de passer après douze heures au bichromate pur, il est quelquefois préférable après ce temps d'allonger le liquide d'eau, et d'y achever le durcissement (quatre jours).

D'après notre expérience personnelle, ce mélange est excellent. Il ne faut pas chercher à augmenter la concentration du chlorure de platine au delà de la proportion indiquée, car les solutions trop fortes ont une tendance à cristalliser sur les tissus.

59. Bichromate d'ammoniaque. — Ce sel a une action sensiblement identique à celle du bichromate de potasse. Nous avons constaté, en compulsant la littérature, qu'il devient maintenant fort à la mode, mais nous ne saurions trop dire pour quel motif. Fol dit qu'il pénètre plus rapidement que le sel potassique, et durcit en même temps plus lentement, ce qui fait qu'il est bon de l'employer à des doses un peu plus fortes, à savoir 5 p. 100 au lieu de 4 p. 100.

60. Chromate neutre d'ammoniaque. — Quelques anatomistes ont trouvé que ce sel offrait des avantages pour le durcissement de certains organes. Klein l'a recommandé pour l'intestin, qu'il durcit en vingt-quatre heures, à une concentration de 5 p. 100. Fol trouve qu'il ne présente pas d'avantage sur les bichromates.

61. Sulfate de cuivre. — Nous avons dit que ce sel est par lui-même un durcissement énergique. On ne l'emploie cependant guère seul, vu qu'il ne donne pas aux tissus une consistance suffisante.

Friedlaender (*Biol. Centralb.*, X, 1890, p. 483 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 804) fixe les animaux pélagiques délicats en les inondant d'un mélange de sulfate de cuivre 125 parties, sulfate de zinc 125 parties, eau 1000 parties. J'ai pu constater que le sulfate de cuivre possède certainement des qualités pour ce genre d'objets. Nous reviendrons là-dessus à propos de la méthode de Bedot pour la conservation des Siphonophores, n° 798.

61 *bis*. — **L'alun** a été employé comme agent fixateur.

J'en ai fait moi-même une expérience considérable, et si je le cite, c'est pour recommander de l'éviter à tout prix.

Digitized by Google

CHAPITRE IV

AGENTS FIXATEURS ET DURCISSANTS

CHLORURES

62. Bichlorure de mercure (sublimé corrosif). — Ce sel se trouve dans le commerce sous forme de poudre cristalline parfaitement stable. Sa solution aqueuse saturée à froid contient environ 5 p. 100 du chlorure. Il est plus soluble dans l'alcool que dans l'eau, et en employant de l'alcool de 50 à 60 degrés, on obtient des solutions bien plus fortes.

Sa solubilité dans l'eau ou l'alcool est augmentée par l'addition d'acide chlorhydrique, de chlorure d'ammonium, de camphre ou d'iode. Avec du chlorure de sodium il forme un sel double beaucoup plus soluble; l'eau de mer peut en dissoudre jusqu'à 15 p. 100 (de là la composition du liquide de LANG).

Les solutions aqueuses se détériorent assez rapidement par la formation d'un précipité pulvérulent très fin. Je ne connais aucun moyen sûr de prévenir la formation de ce précipité. Cependant, pensant qu'il peut être dû en partie à l'ammoniaque de l'air, j'ai pris le parti depuis quelque temps d'additionner mes solutions d'un peu d'acide nitrique, et je m'en suis bien trouvé.

Néanmoins, toutes les fois qu'on veut déployer *toute la puissance* fixatrice du sublimé, il sera bon de n'employer que des solutions récemment préparées ; et même pour le travail ordinaire il est bon de ne pas préparer de grandes provisions de ce réactif à la fois.

Pour les fixations nous recommandons (et nous croyons que c'est la pratique générale) de prendre des solutions aussi concentrées que possible. La solution aqueuse saturée à froid suffira le plus souvent; mais pour les Arthropodes il faudra souvent prendre une solution

Digitized by Google

alcoolique, et pour les animaux très contractiles (Coralliaires, Planaires) il faudra souvent avoir recours à des solutions chaudes, même bouillantes.

Il y a très souvent utilité à acidifier les solutions par l'acide acétique. On peut ajouter sans crainte 1 p. 100 de cet acide (liquide de Keiser). Une solution saturée de sublimé dans de l'acide acétique à 5 p. 100 m'a donné de très bons résultats *pour les animaux marins*. Van Beneden a employé une solution saturée dans de l'acide acétique à 25 p. 100.

Il est bon en règle générale, du moins si l'on a employé une solution concentrée, de *ne laisser les objets dans la solution que juste le temps nécessaire pour qu'ils en soient pénétrés*. La pénétration se constate facilement à la vue de l'opacité blanchâtre qui se produit dans les tissus. Elle est très rapide; les petits objets (et autant que possible on ne doit pas en prendre de gros) sont fixés en quelque minutes; nous avons trouvé que pour pénétrer une glande salivaire de *Chironomus* il ne faut pas plus de trois secondes.

On lave à l'eau ou à l'alcool. Nous pensons que l'alcool vaut presque toujours mieux.

Nous ajouterons qu'il est souvent important de ne pas prendre l'alcool trop faible, mais de commencer les lavages par l'alcool d'au moins 70 degrés. On peut y ajouter un peu de camphre, ce qui facilite l'extraction du sublimé. Ou bien ce qui vaut mieux, à cet effet on ajoute à l'eau ou à l'alcool de lavage de la *teinture d'iode*, et on en renouvelle l'addition jusqu'à ce que les objets n'en absorbent plus, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils ne décolorent plus le mélange au bout de quelque temps. Cette pratique a l'avantage de diminuer la tendance qu'a le sublimé à rendre les tissus cassants. Elle sert aussi dans certains cas à faciliter les colorations. *On ne doit pas* prendre la solution d'iode dans l'iodure de potassium (voy. n° 66).

Il peut arriver que si l'extraction du sublimé a été insuffisante, ce sel vienne à former des cristaux dans les coupes, après le montage dans le baume. On prévient facilement cela en traitant les coupes pendant un quart d'heure par de la teinture d'iode. Si l'on a préféré cette manière de faire, l'addition d'iode à l'alcool de lavage après fixation est superflue, à moins que les pièces ne doivent être gardées longtemps dans l'alcool avant la confection des coupes.

La croyance qu'il est *nécessaire* de laver par l'*eau* les objets qui ont été traités par le sublimé est une erreur. Il importe que les lavages soient scrupuleusement faits, autrement les tissus deviendront granuleux et cassants. Il faut aussi, autant que possible, ne pas laisser les

Digitized by Google

objets trop longtemps dans l'alcool, autrement ils peuvent devenir cassants.

On peut colorer avec n'importe quel colorant. Il n'est pas même toujours nécessaire que le sublimé soit enlevé des pièces avant de les mettre dans la solution colorante. Ainsi, dans la pratique, il arrive souvent qu'on lave pendant quelques minutes ou une demi-heure dans l'eau, qu'on passe alors les pièces pendant une demi-heure dans du carmin au borax, du picro-carmin, du carmin à l'alun ou de l'hématoxyline, et que l'on achève l'extraction du sublimé par les mêmes lavages qui servent à débarrasser les pièces de l'excès de matière colorante. On les passe alors aussi rapidement que possible à travers des alcools successivement plus forts, et, après vingt-quatre heures on peut les enrober, couper, ou monter en préparations permanentes, selon la méthode que l'on préfère.

Nous pensons que le sublimé corrosif est un fixateur de *premier ordre*, pourvu toutefois que l'on observe la précaution que nous avons indiquée, de ne le laisser agir que pendant le temps voulu sur les tissus, et de l'en éloigner ensuite rapidement et complètement. Il est d'un emploi très commode, et permet d'aller très vite. Il permet des colorations très faciles et belles avec le carmin, etc.

Le lecteur se souviendra qu'il ne doit pas employer d'instruments métalliques pour manipuler les objets contenus dans les solutions mercuriques, ces solutions se précipitant immédiatement au contact des métaux. Pour ces objets, il faut se servir d'instruments de verre, d'ivoire, de corne, de caoutchouc, de bois, de piquants de hérisson ou de porc-épic.

Les solutions de sublimé pur, de même que les mélanges mercuriques qui vont suivre, paraissent convenir pour la grande majorité des organismes, excepté les Arthropodes à squelette un peut fort, le sublimé ne pénétrant pas la chitine avec beaucoup d'énergie.

MÉLANGES MERCURIQUES

63. Liqueur de Lang (*Zool. Anzeiger*, 1878, p. 14). — On prend :

Eau distillée	100	parties.
Chlorure de sodium	6 à 10	—
Acide acétique	5 à 8	—
Bichlorure de mercure	3 à 12	—
Alun (dans certains cas)	0,5	—

Pour des Planaires surtout. On couche les animaux sur le dos et on les inonde du mélange versé brusquement. Ils meurent étendus. On les laisse une demi-heure dans le liquide, et on les passe dans l'alcool.

Digitized by Google

Nous avons trouvé ce mélange excellent pour fixer des animaux pélagiques mous, tels que *Salpa*, *Doliolum*.

64. — CARNOY (*La Biologie cellulaire*, p. 95) recommande les deux mélanges suivants, selon qu'on désire employer un liquide alcalin ou acide.

Liquide alcalin :

Eau distillée	100 parties.
Bichlorure de mercure	5 —
Chlorure de sodium	3 —

Liquide acide :

Eau distillée	100 parties.
Bichlorure de mercure	5 —
Acide acétique	5 —

65. — Les liquides de HARTING (*Micro. Diction.*, art. *Préservation*) et de PACINI (*Journal de Micrographie*, IV, 1880 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, N. S. II, 1882, p. 702) doivent être cités ici, quoiqu'ils ne constituent que des fixateurs peu énergiques et d'une application très restreinte.

Harting prend :

Sublimé	1 partie.
Eau distillée	200 à 500 —

(Pour corpuscules du sang et quelques autres éléments.)

Pacini prend :

1° Sublimé . . . . . 1 partie.
Sel de cuisine . . . . . 2 —
Eau. . . . . 200 —

(Pour Infusoires, globules du sang, spermatozoïdes.)

2° Sublimé . . . . . 1 partie.
Sel de cuisine. . . . . 4 —
Eau . . . . . 200 —

(Corpuscules du sang des Vertébrés.)

3° Sublimé . . . . . 1 partie.
Acide acétique . . . . . 2 —
Eau . . . . . 300 —

Noyaux des tissus des animaux. Ne conserve pas les corps cellulaires. (Pour l'emploi de ces mélanges comme liquides conservateurs, voyez au chapitre des *Liquides additionnels*.)

Un liquide contenant 5 grammes de sublimé, 50 centigrammes de chlorure de sodium et 100 cc. d'eau a été cité sous le titre de *Solution de* GAULE.

66. Liqueur de Gilson (*La Cellule*, I, 1886, p. 57). — Nous don-

Digitized by Google

nons ici une formule modifiée qui nous a été obligeamment communiquée par M. le professeur GILSON (1893 et 1895).

Acide nitrique à 46° Baumé.	78 cc.
Acide acétique cristallisable.	22 —
Sublimé	95 à 100 grammes
Alcool à 60 p. 100.	500 cc.
Eau distillée	4400 —

« Ce mélange donne en général une fixation très délicate et une bonne consistance, ce qui n'est pas le cas pour toutes les solutions mercuriques. Elle n'est en rien nuisible aux colorations. Son action peut être prolongée non pas indéfiniment, mais du moins très longtemps sans trop d'inconvénient. Elle est très pénétrante.

« Pour des *animaux marins* il est bon d'ajouter au fond de la bouteille des cristaux d'iode ; on évite ainsi tout précipité par les sels. »

« Vous aurez peut-être remarqué (continue mon savant correspondant) que les solutions mercuriques donnent souvent des granules dans certains organes, par exemple, dans le testicule des larves de Lépidoptères et autres organes à prolifération active. Cela pourrait bien être dû à une abondance de phosphates. On les évite grâce à l'iode, et en tout cas si on les constate dans une coupe on peut les faire disparaître en lavant à l'eau additionnée de teinture d'iode (*il faut bien se garder de l'iodure*, qui précipiterait le sublimé). »

GILSON recommande beaucoup ce réactif comme donnant de bons résultats, et comme évitant bien des déboires dans les laboratoires où il y a des commençants. Car un excès de fixation, un lavage incomplet, etc., ne causent pas la perte irréparable de l'objet.

On pourra trouver ce réactif utile pour débarrasser les œufs des Batraciens de leur albumine ; ils s'y débarrassent aussi bien qu'avec les solutions chromiques et y prennent une bonne consistance.

Je l'ai essayé, et j'ai eu de bons résultats. Trouvant la fixation un peu trop faible pour mes objets, j'ai augmenté considérablement la proportion de sublimé, et je m'en suis bien trouvé. J'ai également expérimenté avec des solutions simples de sublimé additionnées d'acide nitrique, et je crois cette addition très recommandable. Il paraît que FRENZEL a déjà formulé l'addition de 1 goutte d'acide nitrique pour chaque centimètre cube de solution saturée de sublimé. (MANN, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 480.)

67. Bichlorure de mercure et acide picro-sulfurique (*Formule de* LANG ; *Zool. Anzeiger*, 1879, p. 46). — Solution saturée de sublimé corrosif dans de l'acide picro-sulfurique auquel on a ajouté 5 p. 100 d'acide acétique.

Digitized by Google

68. Bichlorure et acide picrique (RABL, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 165).

Sublimé, sol. sat. aq.	1	volume.
Acide picrique, sol. sat. aq.	1	—
Eau distillée	2	—

RABL y laisse des embryons environ douze heures, lave pendant deux heures à l'eau, et passe dans l'alcool faible.

La solution de MANN (*op. cit.*, XI, 4, 1895, p. 480) contient 1 p. 100 d'acide picrique avec ou sans 1 p. 100 de tanin dans une solution saturée de sublimé dans de la solution physiologique de sel.

68 *bis*. Liquide de Zenker (*Münchener med. Wochenschr.*, n° 24, 1894, p. 532). — C'est du liquide de MÜLLER (n° 56) additionné de 5 p. 100 de sublimé corrosif et 5 p. 100 d'acide acétique cristallisable (il vaut mieux ajouter ce dernier au moment de s'en servir). Fixer plusieurs heures, laver à l'eau, traiter les pièces ou les coupes par l'alcool iodé (n° 62). Recommandé avec des détails minutieux, par MERCIER, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 471.

69. Sublimé alcoolique (MANN, *Anat. Anz.*, VIII, 1893, p. 441-443).

Alcool absolu	100	cc.
Acide picrique.	4	grammes.
Sublimé	15	—
Acide tannique.	6 à 8	—

L'acide tannique est ajouté pour prévenir un durcissement excessif.

69 *bis*. Sublimé et acide osmique (MANN). — Ce mélange a été donné au numéro 39.

AUTRES CHLORURES

70. Chlorure de platine, $PtCl^4$. — Ce sel étant extrêmement déliquescent, il vaut mieux se le procurer en solution. On trouve en effet dans le commerce des solutions à 10 p. 100. La solution aqueuse simple de ce sel a jusqu'à présent peu servi. RABL (*Morphol. Jahrb.*, X Bd., 1884, p. 216) s'en est servi dans ses recherches sur la cytodiérèse. Elle a une action semblable à celle du chlorure d'or, avec l'avantage de ne pas être réduite par la lumière ou la chaleur.

Rabl se sert d'une solution de 1/300. Il y laisse les objets pendant vingt-quatre heures. Il lave à l'eau, durcit ensuite à l'alcool, fait des coupes, et les colore avec l'hématoxyline de Delafield, ou la safranine.

C'est surtout sous forme de mélanges que sert le chlorure de platine. Nous avons parlé plus haut (n° 53) du *mélange de* MERKEL, et nous allons maintenant en citer un autre qui est très en vogue à l'heure qu'il est.

Digitized by Google

71. Mélange platino-acéto-osmique (HERMANN, *Arch. f. mik. Anat.*, XXXIV, 1889, p. 58). — HERMANN a proposé de substituer la solution de chlorure platinique à 1 p. 100 à la solution d'acide chromique dans la liqueur de FLEMMING, *Nouvelle Formule*, soit *Mélange fort*, les autres ingrédients restant les mêmes, ou bien l'acide osmique étant diminué de moitié. Il croit avoir obtenu ainsi une fixation plus fidèle des parties plasmatiques des tissus. Nous avons noté plus haut (n° 41) que l'acide chromique a le défaut de précipiter certains constituants liquides des tissus sous forme de réseaux ou de filaments qui peuvent simuler des éléments normaux des tissus. Le chlorure platinique n'a pas cet effet.

C'est là certainement un avantage, qui peut être considérable en certains cas. J'ai trouvé aussi que les pièces brunissent moins qu'avec l'acide chromique, et il me semble que les coupes sont moins opaques. A part cela, après des essais soigneux de ce réactif, je n'ai pas pu trouver qu'il possède une supériorité réelle sur celui de FLEMMING, il m'a semblé même souvent qu'il donnait des fixations moins bonnes. Et comme il est en même temps extrêmement coûteux, il me semble qu'il y a lieu de le réserver pour des recherches spéciales, et de continuer à employer le liquide de FLEMMING pour les travaux ordinaires.

Le traitement ultérieur des préparations est le même que pour le liquide de FLEMMING.

71 *bis*. Sublimé platinique (RABL) v. numéro 553.

72. Le chlorure de palladium a été employé comme fixateur en solutions aqueuses de 1/300, 1/600, ou 1/1000. La fixation se fait en une ou deux minutes, pour les petits objets. CATTANEO le recommande comme étant le meilleur fixateur pour les Infusoires.

Ce sel se trouve à l'état sec dans le commerce. Pour le dissoudre, il est nécessaire d'employer de l'eau acidulée avec de l'acide chlorhydrique. Il faut prendre, pour 10 grammes du chlorure sec, un litre d'eau et 4 à 6 gouttes de HCl. Il faut vingt-quatre heures pour que la dissolution soit complète.

Ce chlorure imprègne les tissus en les colorant en brun.

Il a été employé comme agent *durcissant*, voyez F.-E. SCHULTZE, *Arch. f. mik. Anat.*, III, 1867, p. 477.

73. Perchlorure de fer (H. FOL, *Zeit. wiss. Zool.*, XXXVIII, 1883, p. 491 ; Fol, *Lehrb. d. vergl. mik. Anat.*, p. 102). — Ce réactif a trop de défauts pour qu'on puisse le recommander.

74. Le chlorure de zinc n'est employé que pour l'*encéphale*. Voyez dans la Deuxième partie.

Digitized by Google

CHAPITRE V

AGENTS FIXATEURS ET DURCISSANTS

ACIDES ORGANIQUES ET AUTRES AGENTS

75. Acide picrique. — Cet acide se trouve dans le commerce sous forme de beaux cristaux d'un beau jaune serin. Ces cristaux stables, hexagonaux, peuvent commodément être conservés en nature. Ils se dissolvent dans l'eau et dans l'alcool. Dans l'eau froide, ils se dissolvent en raison d'environ 1 partie pour 75 d'eau ; dans l'eau chaude ils sont beaucoup plus solubles.

Pour les fixations, on emploie en général la solution aqueuse saturée à froid. On doit toujours avoir soin d'employer des solutions fortes toutes les fois qu'il s'agit de faire des coupes ou de préparer des organes avec les éléments *in situ*, parce que les solutions faibles macèrent les tissus. Pour l'étude d'éléments cellulaires isolés, on peut prendre des solutions faibles.

On peut laisser les objets à fixer très longtemps — jusqu'à vingt-quatre heures, par exemple — dans cet acide, sans qu'ils en souffrent. Il est cependant extrêmement pénétrant, et peut fixer de petits objets en quelques instants.

On lave toujours à l'alcool, pour les motifs que nous avons exposés dans l'introduction, au numéro 5. Cette règle ne souffre pas d'exception pour l'acide picrique pur, et s'applique également à l'acide picro-sulfurique, l'acide picro-nitrique et l'acide picro-chlorhydrique. L'acide picro-chromique permet un court lavage à l'eau (Fol). Pour la même raison, on doit éviter l'emploi des liquides aqueux pendant tout le cours de la préparation ultérieure ; on colore donc avec des teintures alcooliques. (On peut à la rigueur se servir de certaines teintures aqueuses, à condition qu'elles contiennent une proportion suffisante de quelque réactif durcissant pour leur permettre de ne pas déformer les cellules ; et l'on a cité à ce propos le picro-carmin, qui remplirait cette condition en vertu de l'acide picrique qu'il contient.)

C'est avec l'alcool à 70 degrés que l'on commence les lavages en général. Il faut le renouveler aussitôt qu'il devient trouble, et continuer les lavages us qu'à ce que les tissus soient bien débarrassés de la coloration jaune que leur a donnée l'acide picrique. Les lavages seront facilités de beaucoup si l'on emploie l'alcool à chaud ; à la température de 40° l'acide picrique est en

Digitized by Google

effet presque deux fois aussi soluble dans cet alcool qu'à la température normale (Fol).

JELINEK (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 242) dit que l'extraction de l'acide est notablement activée par l'addition de carbonate de lithine à l'alcool de lavage. On y ajoute quelques gouttes d'une solution aqueuse saturée. Il se produit un léger précipité. On introduit maintenant les objets dans cet alcool trouble et l'on remarque qu'il commence à s'éclaircir en même temps qu'il prend une coloration jaune et que les objets se décolorent. On ajoute de nouvelles quantités de la solution de carbonate jusqu'à ce que la réaction ne se produise plus et que les objets soient devenus incolores.

C'est l'un des grands avantages de l'acide picrique, qu'il se laisse entièrement extraire par l'alcool et laisse les tissus dans un état où ils sont susceptibles des plus belles colorations par tous les colorants ordinaires.

Une qualité très précieuse, c'est sa *grande puissance de pénétration*. Cette propriété, jointe à cette autre, qu'il ne nuit nullement aux éléments des tissus lors d'une immersion prolongée, fait des liquides picriques les *fixateurs par excellence des Arthropodes*.

En dehors de cela il laisse à désirer sous beaucoup de rapports. Les lavages nécessaires pour l'éloigner des tissus n'opèrent que très lentement ; il faut souvent des semaines entières pour les mener à bonne fin. Il est un fixateur très peu énergique : on lui souhaiterait le plus souvent une action coagulante beaucoup plus prononcée. On n'arrive à parer que partiellement à ces deux inconvénients en combinant l'acide picrique avec d'autres réactifs, comme dans les mélanges qui vont suivre.

76. Acide picro-sulfurique (*Liqueur de* KLEINENBERG ; *Quart. Journ. Mic. Science*, avril 1879, p. 208. — *Formule de* PAUL MAYER ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, N. S., 2, 1882, p. 867. D'après Whitman). —

Nous supprimons la formule originelle donnée par Kleinenberg pour la préparation de ce liquide, celle que nous donnons étant beaucoup plus commode. Prenez :

Eau distillée.	100 volumes.
Acide sulfurique concentré	2 —

Mêlez et ajoutez de l'acide picrique autant qu'il s'en dissoudra.

Ce sera environ 0,25 p. 100, l'acide picrique étant beaucoup moins soluble dans l'eau additionnée d'acide sulfurique que dans l'eau pure.

Filtrez et ajoutez 3 volumes d'eau (excepté pour les Arthropodes, pour lesquels on emploie la solution non diluée). (N'y aurait-il pas avantage à réserver le nom d'« acide picro-sulfurique » à la solution non diluée, et à appeler « Liqueur de Kleinenberg » la solution étendue ? *La solution non diluée est indispensable pour les Arthropodes*, et nous paraît mériter une désignation propre.)

On laisse les objets dans ce liquide, selon leurs dimensions, pen-

Digitized by Google

dant trois ou quatre heures, ou même jusqu'à vingt-quatre heures (les immersions prolongées ne nuisent nullement aux objets). On les porte alors dans de l'alcool à 70 degrés, ou on les lave comme nous l'avons dit pour l'acide picrique. Nous croyons devoir répéter ce que nous avons déjà dit plus d'une fois, que les objets fixés dans les liquides picriques *ne doivent jamais être lavés à l'eau.*

On colore comme nous l'avons dit pour l'acide picrique.

Il y a quelques précautions à prendre avec l'acide picro-sulfurique. Quoiqu'il se diffuse assez rapidement à travers les cuticules, il va sans dire que la chitine épaisse s'oppose à son passage. Les Arthropodes un peu gros, les Insectes et les Isopodes de grande taille, doivent être ouverts et injectés largement avec le liquide à l'aide d'une pipette. De plus, et ceci est un point très important, on emploiera des quantités très grandes de liquide, et on aura le plus grand soin de renouveler le liquide aussitôt qu'il sera devenu trouble. On ne doit jamais laisser les objets pendant un temps considérable dans un liquide qui n'est pas parfaitement limpide.

Ce liquide est un fixateur plus énergique que l'acide picrique pur. Il a en outre l'avantage de se laisser enlever au lavage bien plus facilement. Pour la zoologie marine, il a la propriété très précieuse de débarrasser les organismes des sels de l'eau de mer en même temps qu'il les fixe.

Il a quelques désavantages qui lui sont particuliers. A cause de la présence de l'acide sulfurique, ce réactif gonfle le tissu conjonctif; c'est assez dire que pour les Vertébrés il n'est que d'une application restreinte. Puis, pour les objets qui contiennent des éléments calcaires, il n'est pas à recommander, car il dissout la chaux et la laisse ensuite précipiter dans les tissus sous forme de cristaux insolubles de gypse. Pour de tels objets, il est préférable d'employer un des liquides suivants, acide picro-nitrique, ou acide picro-chlorhydrique.

Dans beaucoup d'objets il produit des gonflements et des macérations. D'après une expérience assez étendue, je dois dire que pour la fixation d'organismes délicats et ayant dans leur composition beaucoup d'eau, tels que les Méduses, ce liquide ne vaut rien. Pour les Arthropodes je trouve que c'est un réactif excellent à cause de sa grande puissance de pénétration pour la chitine. Mais pour le travail ordinaire il est beaucoup moins recommandable, et il me paraît certain que c'est surtout grâce au prestige de l'autorité de Kleinenberg qu'il a pu jouir aussi longtemps de la faveur des anatomistes. On revient maintenant de cet engouement, et l'on fait bien.

J'ajouterai que dans la plupart des cas le *liquide non dilué m'a donné de meilleurs résultats* que le liquide étendu de Kleinenberg.

77. Acide picro-nitrique. (Paul Mayer; *Mitt. Zool. Stat. Neapel*, 1881, p. 5.)

Eau distillée	100 volumes.
Acide nitrique (de 25 p. 100 Az^2O^5). . . .	5 —
Acide picrique, autant qu'il s'en dissoudra.	

Digitized by Google

Propriétés très semblables à celles de l'acide picro-sulfurique, avec l'avantage *de prévenir la formation de cristaux de gypse*, et l'inconvénient d'être beaucoup plus difficile à éloigner des tissus par le lavage. Whitman (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, N. S. 2, 1882, p. 868) rapporte que Paul MAYER le recommande beaucoup, et trouve qu'avec des œufs qui contiennent beaucoup de deutoplasme, comme ceux de *Palinurus*, il donne de meilleurs résultats que l'acide nitrique, l'acide picrique ou l'acide picro-sulfurique.

78. Acide picro-chlorhydrique. (Paul MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel.*, 1881, p. 5.)

Eau distillée	100 volumes.
Acide chlorhydrique (à 25 p. 100 HCl).	8 —
Acide picrique, autant qu'il s'en dissoudra.	

Propriétés semblables à celles de l'acide picro-nitrique.

79. — *Note sur la décalcification au moyen de l'acide picro-nitrique ou l'acide picro-chlorhydrique.* Il vient naturellement à l'esprit que ces deux liquides pourraient être très utiles pour les décalcifications. Paul MAYER fait observer à ce sujet que l'action en est extrêmement rapide et que le dégagement de l'acide carbonique est souvent assez abondant pour produire des lésions dans les tissus par une action mécanique ; de sorte qu'il est souvent préférable d'employer l'acide chromique, d'autant plus que ce durcissant énergique sert d'une façon très efficace à agir contre l'affaissement des tissus qui peut résulter de la disparition de leur charpente calcaire.

80. Acide picro-chromique. — Nous en avons parlé au numéro 45 *bis*.

81. Mélanges picro-osmiques. — FLEMMING (*Zells. Kern-u.-Zellth.*, p. 381) a essayé des mélanges faits en substituant à l'acide chromique des mélanges chromo-osmiques (MAX FLESCH et FLEMMING) de l'acide picrique à 50 p. 100. (*Sic.* Flemming a sans doute écrit 0,5 p. 100.) Ces mélanges donnent des résultats identiques à ceux des mélanges chromo-osmiques, si ce n'est qu'ils rendent les colorations encore plus difficiles.

O. vom RATH (*Zool. Anz.*, XIV, 1891, p. 363) s'est bien trouvé du mélange suivant : Acide picrique, sol. sat. aq., 1000 cc., acide acétique cristallisable 4 cc. et acide osmique 1 gramme. Fixer pendant une heure environ, laver seulement quelques minutes à l'eau et porter dans l'alcool. Si on laisse les pièces trop longtemps dans le mélange, elles brunissent beaucoup.

82. Alcool picrique (GAGE, *Proc. Amer. Soc. Mic.*, 1890, p. 120 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 418). — Alcool à 95 p. 100, 250 ; eau, 250 ; acide picrique, 1. Fixer pendant environ vingt-quatre heures, laver pendant un jour dans de l'alcool de 67 à 70 p. 100, puis pendant encore un jour ou plus dans de l'alcool à 75 à 82 p. 100.

Digitized by Google

83. L'acide acétique et l'acide formique sont surtout employés comme fixateurs *pour les noyaux*. On peut dire d'une manière générale que les meilleures concentrations se trouvent entre les limites de 0,2 à 1 p. 100. Des concentrations supérieures, 5 p. 100 et plus, fixent bien les éléments nucléaires pendant un moment, mais ensuite les font gonfler et pâlir, ce qui n'arrive pas avec les solutions très diluées. Voyez, à ce sujet, FLEMMING, *Zellsubstanz*, etc., p. 102-103 et 380.

L'action de ces deux acides est à peu près la même. L'acide acétique a sur l'acide formique l'avantage d'être cristallisable, ce qui permet de titrer facilement les solutions, en prenant pour point de départ l'*Acidum aceticum glaciale*.

L'acide acétique concentré est souvent fort utile, comme je puis en témoigner, pour tuer et fixer en même temps des organismes extrêmement contractiles, tels que certains Vers, Nudibranches et Cœlentérés. Il a la précieuse qualité de tuer avec une rapidité foudroyante, son action étant peut-être plus rapide que celle d'aucun fixateur connu, sans excepter le sublimé bouillant. Il a une tendance marquée à *fixer les organes dans l'état d'extension*, ce qui est naturellement une qualité précieuse. Il a aussi l'avantage de ne pas causer d'opacité dans les tissus, qu'il laisse aussi transparents que pendant la vie. La raison pour laquelle on ne l'emploie pas plus souvent, c'est que son action laisse à désirer sous le rapport de la bonne conservation des fins détails histologiques et cytologiques. Le *modus operandi* est d'inonder brusquement les organismes à fixer avec de l'acide acétique cristallisable ; les y laisser le temps nécessaire pour qu'ils en soient pénétrés — temps qui ne doit pas dépasser cinq à six minutes ; puis les transporter dans l'alcool à 50 ou 70 degrés qu'on a soin de renouveler fréquemment jusqu'à ce que l'acide ait été éloigné. Cette méthode, quelquefois précieuse, est due à van Beneden, voyez « TUNICIERS ».

S. LO BIANCO ajoute à l'acide acétique concentré un dixième de solution d'acide chromique à 1 p. 100. Cette petite quantité sert à combattre utilement l'action trop ramollissante de l'acide organique.

J'ai employé de la même manière le JUS DE CITRON, qui m'a donné des résultats admirables sous le rapport de l'extension, mais je ne suis pas encore à même de me prononcer sur l'état de conservation des tissus.

83 *bis*. Alcool acétique. (CARNOY, *La Cellule* III, 1, 1886, p. 6, et 1887, 2, p. 276 ; van BENEDEN et NEYT, *Bull. Acad. Roy. Sci. Belg.*, XIV, 1887, p. 218 ; ZACHARIAS, *Anat. Anz.*, III, 1888, p. 24-27 ; van GEHUCHTEN, ibid., 8, p. 237.) — Réactif important. CARNOY en a donné deux formules. La première :

Acide acétique cristallisable	1 volume.
Alcool absolu	3 —

La deuxième :

Aide acétique cristallisable	1 volume.
Alcool absolu	6 —
Chloroforme	3 —

L'addition de chloroforme rend l'action du mélange plus rapide.

Digitized by Google

Van Beneden et Neyt prennent des volumes égaux d'acide cristallisable et alcool absolu.

Zacharias prend :

Acide acétique cristallisable	1 volume.
Alcool absolu	4 —
Acide osmique, quelques gouttes.	

L'alcool acétique est un des fixateurs les plus pénétrants et des plus rapides qui existent. Il conserve admirablement les noyaux et admet toutes les colorations. Il fut imaginé par les auteurs cités pour la fixation des œufs d'*Ascaris*, objet des plus difficiles ; mais il peut également servir pour beaucoup de tissus.

Lavez à l'alcool, et dans le traitement ultérieur évitez autant que possible l'emploi de l'eau.

84. Liqueur aux sels de cuivre (*Liqueur de* **Ripart** *et* **Petit**). Carnoy. *La Biologie cellulaire*, p. 95.

Eau camphrée	75 gr.
Eau distillée.	75 —
Acide acétique cristallisé	1 —
Acétate de cuivre.	0 — 30
Chlorure de cuivre	0 — 30

Pour éviter le dépôt de cristaux de camphre dans les préparations, on emploie de l'eau camphrée non saturée.

Cette liqueur ne fixe que très modérément, mais conserve néanmoins d'une manière admirable les éléments cellulaires. Elle à le grand avantage de « permettre à l'observateur d'y ajouter, sans amener de précipité, divers corps dont les circonstances lui dictent l'emploi. Ainsi, on peut y ajouter impunément une goutte d'acide osmique, seul ou additionné d'eau de brome, pour fixer davantage les cellules riches en protoplasma. La coloration du noyau s'obtient instantanément au sein de cette liqueur par le vert de méthyle, et elle s'y conserve sans altération pendant longtemps. » (*Loc. cit.*, p. 127.) C'est un réactif *indispensable* pour les travaux délicats qui reposent sur l'observation de cellules *fraîches*, isolées par la dissociation ou observées *in situ*.

85. L'acétate d'uranium a été employé par Schenk (voy. *Mitth. aus. d. embryol. Inst. Wien*, 1882, p. 95). Il convient de se servir d'une solution saturée dans l'eau. C'est un réactif qui, d'après Gilson, donne quelquefois (pas toujours) de fort bons résultats, surtout pour des tissus d'Arthropodes. « Il a l'avantage sur bien d'autres agents fixateurs de ne pas précipiter le vert de méthyle, et de fixer les cellules modérément, sans les contracter. Il

Digitized by Google

a aussi la propriété, signalée par Schenk, de diffuser assez facilement à travers les cuticules. (GILSON, *Spermatogenèse des arthropodes*, dans *La Cellule*, I, 1885, p. 141.)

86. L'iode est un réactif durcissant, qui pénètre rapidement, et qui, quoiqu'il ne conserve pas les cellules avec une grande fidélité, peut cependant rendre des services pour des préparations extemporanées. On s'en sert en solution aqueuse dans l'iodure de potassium. Voici, d'après FOL, la formule de la solution de LUGOL.

Eau	100 parties.
Iodure de potassium	6 —
Iode	4 —

FOL prend une solution saturée d'iode dans une solution aqueuse concentrée d'iodure de potassium et l'étend selon les cas de 100 à 500 volumes d'eau. (FOL, *Lehrb.*, p. 103.)

S. KENT a trouvé ce réactif souvent meilleur que l'acide osmique pour fixer les Infusoires.

Nous faisons observer qu'il fonctionne comme fixateur dans le « Sérum iodé ».

On peut fixer instantanément les petits objets par les VAPEURS D'IODE. On chauffe des cristaux d'iode dans un tube à essais jusqu'à ce que les vapeurs se dégagent; puis en inclinant le tube on les fait couler sur la préparation déjà placée sur un porte-objet. Le porte-objet doit alors être chauffé à environ 40° C. pendant deux ou trois minutes pour chasser l'iode de la préparation. (OVERTON, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, I, 1890, p. 14.)

87. Les alcools. — Sous ce titre nous comprenons les divers mélanges d'alcool éthylique avec de l'eau dont on se sert en histologie. De tous ces mélanges, il n'y a guère que les alcools dilués, au tiers environ, d'un côté, et, de l'autre, l'alcool absolu, qui puissent être considérés comme des agents fixateurs. L'*alcool absolu* a l'effet d'un fixateur parce qu'il tue et coagule les éléments avec une telle rapidité qu'ils sont fixés dans leur forme avant que l'action déshydratante, pourtant si énergique, de cet alcool, ait eu le temps de déformer les structures molles. Il y a bien déshydratation et ratatinement, mais c'est l'action coagulante rapide qui l'emporte, et l'on obtient des fixations qui peuvent quelquefois compter parmi les meilleures. L'action des alcools dilués repose sur un principe opposé. Dans ce cas, on choisit une dilution telle que l'alcool, qui, tout en gardant une propriété coagulante suffisante, contienne cependant en même temps une proportion suffisante d'eau pour que son action déshydratante soit pratiquement nulle ou du moins insignifiante. C'est l'*alcool au tiers* qui réalise le plus complètement ces conditions. Dans les alcools intermédiaires entre celui-ci et l'alcool absolu, c'est l'action déshydratante qui a le dessus, de telle sorte qu'on ne peut

Digitized by Google

pas les employer seuls comme fixateurs. Nous ferons observer cependant qu'on peut très bien les employer comme véhicules d'un fixateur foudroyant, et qu'il est quelquefois même avantageux de le faire. Nous pouvons ainsi augmenter la puissance de pénétration du sublimé corrosif. On peut également combiner avec l'alcool l'acide chromique ou l'acide nitrique. C'est en général l'*alcool à* 70 *degrés* qu'il convient d'employer pour ces sortes de mélanges.

Voici, d'après Gay Lussac, un tableau destiné à donner la proportion d'eau qu'il faut ajouter à 100 volumes d'alcool d'un titre supérieur pour le ramener à un titre inférieur demandé. On cherche dans la colonne horizontale, en haut, le titre de l'alcool à diluer, et dans la colonne verticale, à gauche, celui auquel on désire arriver. Le chiffre inscrit à l'angle où se rencontrent le prolongement en bas de la première colonne et le prolongement à droite de la seconde indique *en volumes* la proportion d'eau qu'il faut prendre.

Ainsi, pour ramener 100 volumes d'alcool à 70 p. 100 au titre de 30 p. 100, on trouve qu'il faut 136 volumes d'eau.

ALCOOL faible demandé.	ALCOOL FORT A DILUER								
	90 p. 100	85 p. 100	80 p. 100	75 p. 100	70 p. 100	65 p. 100	60 p. 100	58 p. 100	50 p. 100
p. 100. 85	6.56								
80	13.79	6.83							
75	21.89	14.48	7.20						
70	31.05	23.14	15.35	7.64					
65	41.53	33.03	24.66	16.37	8.15				
60	53.65	44.48	35.44	26.47	17.58	8.76			
55	67.87	57.90	48.07	38.32	28.63	19.02	9.47		
50	84.71	73.90	63.04	52.43	41.73	31.25	20.47	10.35	
45	105.34	93.30	81.38	69.54	57.78	46.09	34.46	22.90	11.41
40	130.80	117.34	104.01	90.76	77.58	64.48	51.43	38.46	25.55
35	163.28	148.01	132.88	117.82	102.84	87.93	73.08	58.31	43.59
30	206.22	188.57	171.05	103.53	136.04	118.94	101.71	84.54	67.45

Digitized by Google

88. Alcool absolu. — Se trouve dans le commerce. Difficile à préparer, il est également difficile à conserver, parce qu'il est très hygrométrique. Fol recommande de le conserver dans des flacons à double fermeture, et d'y ajouter quelques morceaux de chaux vive. L'addition de cette substance serait utile, non seulement pour maintenir le titre de l'alcool en absorbant à mesure l'eau qui peut s'y introduire, mais aussi pour neutraliser les acides qui se trouvent presque toujours présents dans l'alcool du commerce. Je crois devoir ajouter à cela que l'alcool du commerce, s'il est souvent acide, est aussi très souvent alcalin.

Nous avons rencontré la recommandation d'y suspendre des bandes de gélatine, ce qui suffirait non seulement à le maintenir absolu, mais même à le rendre tel. C'est possible, mais il ne faudrait pas oublier que par ce moyen on risquerait de le rendre en même temps acide.

Ranvier a introduit dans son laboratoire la méthode suivante pour préparer soi-même un alcool suffisamment « absolu » pour tous les usages pratiques. On prend un flacon à large goulot et de la contenance d'un litre, et on le remplit aux trois quarts d'alcool ordinaire fort. On y verse alors une certaine quantité de sulfate de cuivre calciné, en poudre, on ferme vite le flacon et l'on agite. On laisse en contact pendant un jour, en agitant de temps à autre. Puis on décante et l'on répète l'opération avec une nouvelle dose de sulfate de cuivre. Dès qu'en ajoutant une nouvelle portion de sulfate de cuivre calciné, on n'obtient pas de bleuissement de ce sel, et qu'en mêlant une goutte de l'alcool à une goutte de térébenthine on n'obtient pas de gouttelettes d'eau visibles au microscope, on peut estimer que l'alcool est suffisamment anhydre pour tous les usages ordinaires.

Pour préparer le sulfate de cuivre, on prend du sulfate de cuivre ordinaire ($CuSO^4 + 5Aq$), on le réduit en poudre, et on le chauffe au rouge pour chasser l'eau de cristallisation.

Nous faisons observer que pour les fixations on fait bien d'être extrêmement exigeant quant au titre de l'alcool.

Pour les fixations, il faut avoir soin d'employer une proportion très grande d'alcool. Les pièces fixées ne doivent pas être conservées dans l'alcool absolu, qui les rendrait cassantes, mais dans l'alcool à 90 p. 100 environ. Et il est même bon de ne pas les laisser trop longtemps dans ce dernier, si l'on veut obtenir de bonnes colorations nucléaires. Comme colorant des objets traités par l'alcool absolu, on peut employer le picro-carmin ou le carmin à l'alun, ou le vert de méthyle.

Ce réactif est naturellement très pénétrant. Cette propriété fait qu'il est fort utile pour la conservation de certains organismes qui se trouvent être parmi les plus imperméables. Ainsi Mayer trouve que l'alcool absolu et bouillant est le seul réactif qui permette de fixer

Digitized by Google

certains Arthropodes assez rapidement pour éviter la macération des parties internes, macération qui a lieu lorsqu'on emploie l'alcool ordinaire et froid, qui pénètre avec une trop grande lenteur (surtout chez les Trachéates). Pour les *Spongiaires* et les larves de ce groupe, c'est apparemment l'alcool absolu qui fournit les pièces le mieux conservées.

89. Alcool au tiers (*allemand :* **Drittelalcohol ; Ranviersche Alcohol dilutus ;** *anglais :* **One-third alcohol ;** *italien :* **Alcool al terzo**). — (Ranvier, *Traité technique d'Histologie*, 241 et *passim.*) Cet alcool est composé de 2 parties d'eau et de 1 partie d'alcool à 36° Cartier (= environ 39° Baumé). Puisque l'alcool à 36° Cartier ou 39° Baumé contient 89, 6 p. 100 d'alcool absolu, il s'ensuit que l'alcool au tiers contient un peu plus de 30 p. 100 d'alcool absolu. Nous recommandons de le titrer soigneusement, car les effets peuvent dépendre en grande partie du degré de dilution. (Voy. le tableau du numéro 87.)

L'action de ce réactif est très peu énergique et partant laisse beaucoup à désirer sous le rapport de la conservation. Les noyaux surtout sont conservés d'une façon tout à fait insuffisante. Il ne durcit même pas toujours suffisamment pour permettre aux tissus de résister au ratatinement causé par l'emploi subséquent d'alcools plus forts. C'est donc surtout pour les *préparations extemporanées*, et comme moyen commode de préparer des organes pour la dissociation, qu'il peut rendre des services. On peut laisser les objets jusqu'à vingt-quatre heures dans cet alcool, mais pas davantage, à moins qu'on ne désire produire la macération des tissus. On peut colorer avec le picro-carmin, le carmin aluné ou le vert de méthyle.

90. Alcool acidulé (Paul Mayer, *Mitth. Zool. Stat. Neapel.*, II, 1881, p. 7). — On ajoute 3 volumes d'acide chlorhydrique pur à 97 volumes d'alcool à 90 degrés dans lequel on a préalablement fait dissoudre un peu d'acide picrique. On ne doit y laisser les objets que juste le temps nécessaire pour assurer la pénétration de l'alcool. Ensuite on lave dans de l'alcool pur à 90 degrés jusqu'à ce que la coloration jaune de l'acide picrique ait disparu, ce qui est un signe que l'acide chlorhydrique a également été éloigné.

Ce mélange ne remplit pas l'office d'un fixateur histologique proprement dit, vu qu'il ne conserve pas suffisamment bien les éléments ; il sert pour la préparation des pièces qu'on désire conserver dans l'alcool pour l'étude et la dissection *macroscopiques*. L'addition de l'acide chlorhydrique a pour but de prévenir le collage des organes par les liquides périviscéraux qui est la suite ordinaire de l'action de l'alcool pur ; et aussi de prévenir la précipitation à la surface des organes des sels de l'eau de mer, circonstance qui met obstacle à la pénétration de l'alcool lui-même, puis à celle des liquides destinés à la coloration.

Digitized by Google

Whitman fait observer que ce mélange perd ses propriétés après avoir été gardé quelque temps, la présence de l'acide donnant lieu à la formation de certains éthers. Il ajoute qu'on peut prendre de l'alcool à 70 degrés pour les lavages.

91. Alcool pour les durcissements. — Pour la manière d'employer l'alcool pour les durcissements prolongés, voy. au numéro 33.

L'alcool qu'on emploie le plus souvent pour les durcissements est soit à 90, soit à 95°. L'alcool absolu est en général moins avantageux sous le rapport de la bonne conservation des tissus. Il ne faut pas négliger de commencer par des alcools faibles, pour passer ensuite graduellement aux degrés plus forts. Pour des objets bien fixés, l'alcool à 70 p. 100 est un excellent liquide à employer en premier lieu. De petits fragments de tissus perméables, comme les muqueuses, peuvent être durcis suffisamment en vingt-quatre heures; la moelle et le cerveau demandent de longues semaines.

Nous pouvons dire de l'alcool que, employé seul, il est en général de beaucoup inférieur à la plupart des autres réactifs durcissants: mais que, employé pour faire suite à un bon fixateur et en compléter l'action, il rend des services inappréciables.

92. Pyridine (DE SOUZA, *Comptes rend. hebd. Soc. de Biol.*, 8e sér., IV, n° 35, p. 622). — La pyridine agit en même temps, d'après de Souza, comme durcissant, comme déshydratant et comme éclaircissant. Elle durcit vite. Puisque cette substance est un dissolvant des graisses, il semblerait qu'elle ne puisse avoir en histologie qu'application restreinte.

93. Formaline ou formol. — L'aldéhyde formique, HCHO, produit de l'oxydation de l'alcool méthylique, est un gaz qui se dissout dans l'eau jusqu'à 40 p. 100. Sa solution concentrée se trouve dans le commerce. Elle est livrée par la maison SCHERING (adr. Schering's Grüne Apotheke, Wittick und Benkendorf, 19, Chaussée-Strasse, Berlin, N.) sous le nom de « Formaline », et par la fabrique de teintures « vormals MEISTER, LUCIUS u. BRÜNING », à HÖCHST am Main, sous le nom de « Formol ».

Il a été découvert d'une façon indépendante par F. BLUM (*Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 314) et par HERMANN (*Anat. Anz.*, 11 déc., 1893, p. 112) que cette substance possède des propriétés durcissantes et conservatrices remarquables.

BLUM a expérimenté avec du formol allongé de 10 volumes d'eau (donc de 4 p. 100 d'aldéhyde formique). Il a trouvé que ce liquide pénétrait très bien et durcissait des pièces volumineuses telles que foie, reins, cerveau, plus rapidement que l'alcool, et qu'après dés-

Digitized by Google

hydratation et inclusion à la celloïdine, les coupes se montraient bien conservées et susceptibles de belles colorations par l'hématoxyline et par les couleurs d'aniline.

HERMANN a employé une solution de 0,5 à 1 p. 100 de « formaline » de Schering (je pense qu'il entend dire une solution de formaline allongée d'eau jusqu'à contenir de 0,5 à 1 p. 100 d'aldéhyde formique). Il a trouvé que cette solution durcit un organe tel qu'un cœur de veau parfaitement en douze à vingt-quatre heures. Les organes durcis *conservent à peu près la transparence de la vie*. Un œil peut être durci en vingt-quatre heures de telle sorte qu'avec un rasoir on peut le couper en deux comme une pomme; et après cinq mois dans la solution on peut encore lire des caractères imprimés à travers la cornée et le cristallin. *Les pigments ne sont pas décolorés*. Au point de vue de la *fixation* proprement dite, HERMANN trouve que la formaline ne fixe ni mieux ni moins bien que les fixateurs ordinaires. L'inconvénient qu'il lui trouve pour les travaux histologiques, c'est que le traitement ultérieur par l'alcool agit d'une façon délétère sur les tissus. Il faudrait donc trouver le moyen d'écarter cet inconvénient pour rendre la formaline propre aux travaux histologiques; il serait d'ores et déjà acquis qu'elle a pour la conservation de pièces destinées aux musées une certaine supériorité sur l'alcool; elle ratatine moins, conserve les couleurs naturelles et elle est meilleur marché (1 kilogramme coûte de 4 à 5 marks et fournit 40 litres de liqueur conservatrice). (Au sujet de l'emploi pour les musées, voyez aussi J. BLUM, *Zool. Anz.*, 1893, p. 450.)

WEIGERT (*Anat. Ergebnisse*, 1893, p. 6) a trouvé que des organes de l'axe cérébro-spinal durcis dans le formol peuvent être mordancés avec des sels de chrome et fournir des imprégnations par la méthode de Golgi.

LAVDOWSKY (*Anat. Hefte*, IV, 3, 1894, p. 355; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 507) trouve que le formol fixe très bien les noyaux, mais vacuolise le protoplasme. Combiné avec l'alcool, il donne de meilleurs résultats, d'où les deux formules suivantes :

(1)	Eau distillée	20	parties.
	Alcool à 95 p. 100	10	—
	Formol	3	—
	Acide acétique cristallisable	0,5	—
(2)	Eau distillée	30	—
	Alcool à 95 p. 100	15	—
	Formol	5	—
	Acide acétique cristallisable	1	—

Digitized by Google

Gilson (*in litt.*) a trouvé à peu près la même chose. « Jusqu'à présent, m'écrit-il, il a trouvé qu'employé seul (à 2 p. 100, 5 p. 100, 10 p. 100), c'est un fixateur énergique, assez pénétrant, mais qui déforme notablement. »

Strong (*Anat. Anz.*, X, n° 15, 1895, p. 494) a trouvé que la formaline peut être substituée avec avantage à l'acide osmique dans le mélange osmio-bichromique de la méthode d'imprégnation de Golgi. (Pour des tissus *embryonnaires* cependant, le mélange à la formaline serait inférieur au mélange à l'acide osmique, parce qu'il ne durcit pas suffisamment.) Il ajoute à la solution de bichromate 2,5 à 5 p. 100 de formaline.

Van Gieson (*ibid.*) a trouvé que la formaline à 4, 6, 10 p. 100 (je pense qu'il veut indiquer le pourcentage d'aldéhyde formique) donne une excellente fixation pour la moelle épinière, le cervelet et l'écorce cérébrale de l'homme. On peut appliquer à du matériel ainsi préparé les méthodes de coloration de Weigert, de Rehm et de Niss'l.

Durig (*Anat. Anz.*, X, n° 20, 1895, p. 659) a également substitué la formaline à l'acide osmique dans le mélange d'acide osmique et bichromate de potasse du procédé d'imprégnation au chromate d'argent de Golgi et Ramòn y Cajal. Il recommande un mélange contenant 3 p. 100 de bichromate et 4 à 6 p. 100 d'aldéhyde formique (donc 3 p. 100 de bichromate dissous dans de la formaline allongée de 6 à 10 volumes d'eau). Il pense que la formaline pénètre mieux que l'acide osmique, et ne rend pas les tissus aussi cassants. L'imprégnation paraît être plus certaine qu'avec le mélange de Golgi, et paraît démontrer une plus grande richesse d'éléments nerveux.

Hoyer jun. (*Anat. Anz.*, IX, 1894, *Ergänzungsheft*, p. 236 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XII, I, 1895, p. 28) a eu avec des solutions diluées (de 1-10 ou 1-100) de mauvais résultats. Avec la solution concentrée, il en a eu de bons, les tissus paraissaient mieux conservés que par le sublimé. Après quelques heures de fixation, il durcissait dans l'alcool et enrobait à la paraffine.

Reimar (*Fortschr. d. Med.*, XII, 1894, n° 20, p. 773 ; *Zeit. f. wiss. Mik.* XII, I, 1895, p. 29) a fait des essais comparatifs avec le formol, le sublimé, l'alcool absolu et le mélange de Hermann. Il a employé des solutions à 10 et à 4 p. 100. Ces deux solutions ont donné des résultats sensiblement identiques. Il a trouvé que de ces quatre réactifs, c'est le formol qui pénètre le mieux, et qui donne en général les fixations les plus fines, surtout du cytoplasme. Il conclut que le formol est un des fixateurs les plus fidèles qui existent. Il a une action

Digitized by Google

très rapide, mais durcit peu ; et il a l'avantage qu'on peut y laisser les pièces très longtemps sans qu'elles souffrent.

Lachi (*Monit. Zool. Ital.*, V, 1895, p. 15 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XII, I, 1895, p. 32) a trouvé que le formol, en solution faible ou en solution forte, a une action très délétère sur le tissu conjonctif, dont il dissout la substance fondamentale, et sur les muscles, les muscles striés y perdant leur striation et se ratatinant. (Reimar (*l. c.*) dit au contraire que chez les muscles striés, il y a une absence presque totale de ratatinement.) Mais pour le tissu nerveux et épithélial Lachi trouve que le formol est admirable.

J'ai essayé moi-même de substituer le formol (concentré ou peu dilué) à la solution d'acide osmique des mélanges de Flemming et de Hermann, et je m'en suis bien trouvé. Je ne l'ai pas essayé pur : mais il semblerait déjà que cette substance doive se montrer plutôt utile comme durcissant que comme agent fixateur, et plutôt en mélange que pur.

Digitized by Google

CHAPITRE VI

DES TEINTURES

94. Des diverses sortes de teintures. — Les colorations histologiques peuvent se diviser en deux groupes : les *colorations générales* (ou diffuses), et les *colorations électives* (ou sélectives).

Nous appelons coloration générale, une coloration qui intéresse également *dans leur totalité tous les éléments* anatomiques d'une préparation.

Nous appelons coloration élective, une coloration qui n'intéresse que *quelques-uns de ces éléments*, les autres demeurant incolores ou se colorant d'une autre façon que les premiers. C'est cette *différenciation* des éléments histologiques par la couleur qui est le but principal pour lequel on emploie des réactifs colorants dans la pratique de l'anatomie microscopique.

Les colorations électives se laissent diviser en deux groupes : il y a l'élection *histologique* et l'élection *cytologique*. Dans l'élection histologique, la coloration se porte avec élection sur tous les éléments appartenant *à un tissu donné*, les autres éléments histologiques de la préparation demeurant incolores, ou du moins se colorant d'une autre façon ; exemple : coloration des terminaisons nerveuses par le chlorure d'or ou par le bleu de méthylène. Les colorations de cette sorte s'appellent aussi *colorations spécifiques*.

Dans l'élection cytologique, au contraire, la coloration se porte avec élection sur l'un des *éléments cytologiques des cellules* de tous les tissus de la préparation, c'est-à-dire qu'elle choisit soit les noyaux en général ou un élément des noyaux, soit le cytoplasme ou un élément du cytoplasme, son réticulum, son enchylème, ses granulations ou autres enclaves. La première de ces colorations cytologiques s'appelle coloration *nucléaire*, la seconde, coloration *plasmatique*. Ce sont les teintures nucléaires qui sont, en anatomie

Digitized by Google

microscopique générale, la classe la plus importante de colorations. Car, la plupart du temps, c'est surtout en vertu de leurs propriétés d'élection pour la substance nucléaire que les teintures rendent des services à l'anatomiste. Il s'en sert quelquefois à titre de réactifs chimiques, comme cela arrive, par exemple, lorsqu'il fait usage du vert de méthyle pour déceler la présence de la nucléine, ou pour constater son absence, dans une structure quelconque ; de semblables réactions jouent un rôle considérable dans les études cytologiques. Mais, le plus souvent, le point de vue chimique est relégué à l'arrière-plan, et tout ce que l'anatomiste demande aux teintures, c'est de lui fournir des jalons indiquant les centres histologiques des tissus. Ces jalons, qui sont des noyaux vivement colorés, attirent le regard, qui peut ensuite déchiffrer avec aisance les contours et les rapports des éléments auxquels ces centres appartiennent ; et l'on préfère en général que tout ce qui est en dehors des noyaux reste incolore pour ne rien enlever à la transparence des préparations. Les colorants à action *diffuse*, que nous avons dit être ceux qui se portent sur la *totalité* des éléments des tissus aussi bien que sur les noyaux, sont aujourd'hui de plus en plus abandonnés. Ainsi, l'éosine, qui fut jadis un colorant extrêmement en vogue, ne s'emploie guère plus comme réactif normal, parce qu'elle fournit des colorations diffuses et inacceptables. De pareils réactifs ne s'emploient plus que dans ces cas tout à fait spéciaux, soit pour teindre fortement des membranes qui resteraient invisibles par suite de leur grande ténuité si on ne les colorait pas, soit, quelquefois, en combinaison avec un colorant nucléaire, pour rendre le même service à l'égard d'autres éléments des préparations.

Les *colorants plasmatiques électifs*, au contraire, sont de la plus grande utilité pour certaines recherches spéciales et il devient tous les jours plus évident que pour les études cytologiques ils sont indispensables.

95. Les deux méthodes de teinture. — Dans la pratique, on cherche à réaliser des colorations électives de deux manières qui reposent sur des principes opposés. Ce sont la méthode *directe*, ou méthode de la TEINTURE PROGRESSIVE ; et la méthode *indirecte*, ou méthode de la TEINTURE RÉGRESSIVE. Dans la première, on fait usage de teintures électives, c'est-à-dire de couleurs qui ont une affinité spéciale pour les éléments qu'on désire mettre en relief et les colorent *plus rapidement* que les autres éléments de la préparation ; on interrompt la coloration et on procède au lavage et à la fixation de la cou-

Digitized by Google

leur au moment où celle-ci a été suffisamment absorbée par les éléments à colorer sans avoir encore envahi les autres. C'est la méthode ordinaire des colorations histologiques. Elle présente deux grands avantages : elle permet de colorer en bloc des pièces volumineuses, car le progrès de la teinture n'exige pas un contrôle minutieux ; et elle permet l'emploi des couleurs les plus stables. C'est la méthode des colorations ordinaires par le carmin et l'hématoxyline. Nous indiquerons plus loin les couleurs dont l'emploi rentre dans cette catégorie.

Dans l'autre manière de réaliser des colorations électives, ou méthode régressive, on ne cherche pas à produire une localisation directe de la couleur sur les éléments à colorer, en faisant usage de couleurs qui teignent ces éléments plus rapidement que ceux que l'on désire épargner ; mais on produit d'abord une coloration générale de tous les éléments et l'on cherche ensuite à enlever par des lavages la couleur absorbée par les éléments que l'on désire épargner. C'est la méthode *de coloration suivie de décoloration*, que nous pratiquons si souvent sous forme de teinture au carmin boracique ; c'est aussi la méthode connue sous le nom de procédé de Flemming. C'est le contre-pied exact de la première méthode ; dans celle-ci, on interrompt la *teinture* avant qu'elle ait intéressé les éléments à épargner ; dans l'autre, on interrompt les *lavages* avant qu'ils aient intéressé les éléments dont on désire conserver la coloration. On pourrait appeler la première la méthode de *coloration interrompue ;* la seconde, la méthode de *décoloration interrompue*. Celle-ci s'emploi surtout pour la coloration de coupes. Elle ne s'applique que dans des cas plutôt exceptionnels (carmin boracique) aux pièces volumineuses, car elle exige en général que la décoloration soit surveillée de près ; elle trouve son application la plus importante dans les recherches cytologiques. Elle a l'avange de fournir des colorations nucléaires d'une extrême précision, et, ce qui est encore plus important, de permettre d'utiliser des couleurs produisant leur effet sur des tissus qui ont été fixés par des réactifs, tels que l'acide chromique, qui font obstacle à la coloration directe par les colorants ordinaires. Nous donnerons dans le chapitre IX des instructions détaillées pour l'emploi des couleurs d'aniline en teinture régressive.

Ces deux méthodes peuvent se combiner. Si, par exemple, nous avons cherché à arriver à une coloration nucléaire par voie directe avec le picro-carmin, et que, n'ayant pas interrompu la coloration à temps, nous avons laissé s'établir une coloration diffuse, nous pouvons cependant arriver à la localisation voulue en procédant à la

Digitized by Google

décoloration des éléments extra-nucléaires par le lavage avec une solution faible d'acide chlorhydrique, lavage que nous aurons soin d'interrompre avant qu'il ait intéressé les noyaux.

96. De la préparation préalable des tissus à colorer. — *Les fixations* ont tout autant d'importance pour la réussite des colorations que pour la conservation des tissus. Les éléments des tissus (à part quelques exceptions) ne se colorent pas du tout dans les teintures à l'état vivant. Les tissus récemment morts et non fixés s'y colorent, mais mal, et ne prennent guère qu'une coloration fugitive. Seuls, les tissus convenablement fixés prennent dans les teintures des colorations à la fois énergiques et stables. Bien des considérations portent à croire que dans la plupart de nos colorations histologiques, ce n'est pas la substance originelle des éléments des tissus que nous colorons, mais, au contraire, certains composés chimiques inconnus (peut-être souvent des albuminates métalliques) résultant de la combinaison de cette substance avec d'autres substances qui lui sont apportées dans nos liquides fixateurs et durcissants.

On comprendra donc facilement que la nature chimique des substances que nous employons pour la fixation et pour la préparation ultérieure est d'une grande importance sous le rapport des colorations. Quelques-unes de ces substances produisent des modifications dans les tissus qui s'opposent à leur coloration avec certaines couleurs; d'autres, au contraire, facilitent la teinture *en jouant le rôle de mordants*. Telles sont (pour certaines couleurs) le chrome et ses sels, puis le sublimé corrosif, les aluns, les sels de fer, de platine, de palladium et d'uranium. On cherchera donc à tirer parti de cette propriété de ces substances lorsque l'occasion s'en présentera, et l'on ne perdra pas de vue l'utilité que peut souvent avoir la présence d'une substance agissant *comme mordant* dans les teintures elles-mêmes. L'alun, par exemple, joue dans beaucoup de teintures un rôle très important, quoique jusqu'ici inexpliqué d'une façon satisfaisante. C'est une substance qui pénètre facilement les tissus et s'y attache avec énergie, et qui, d'autre part, se combine facilement avec beaucoup de couleurs. De plus, comme le fait observer Gierke, il s'attache à certains éléments des tissus avec beaucoup plus d'énergie qu'à d'autres ; il a surtout une très grande affinité pour la substance des noyaux. Par suite de ces propriétés, il sert non seulement à rendre certaines couleurs plus stables, mais aussi à leur faire fournir des colorations plus électives que celles qu'elles donnent employées seules.

L'iode, dans plus d'un procédé, joue un rôle semblable, qu'on ne

Digitized by Google

peut expliquer qu'en lui attribuant le caractère de mordant vis-à-vis de *certains éléments* et de *certaines couleurs*.

96 *bis*. Des colorations directes et par Mordançage. — On distingue des couleurs qui se fixent directement sur les tissus; et d'autres qui ne s'y fixent que par l'intermédiaire d'une substance appelée « mordant ». La pratique du mordançage est très peu développée dans la teinture histologique jusqu'à présent, mais elle commence à être employée. On l'a mise en œuvre depuis longtemps pour certaines colorations à l'hématoxyline (Heidenhain et d'autres), et plus récemment, mais rarement, pour les couleurs de la houille.

Nous décrirons au chapitre viii plusieurs colorations par mordançage à l'hématoxyline, et au chapitre x les procédés de coloration par mordançage aux couleurs de la houille de Henneguy, de Rawitz et autres. En outre il faut noter que l'emploi de l'huile d'aniline dans les solutions colorantes, comme aussi celui de l'acide chromique, de l'acide picrique ou de l'iode employés avant la teinture ou ajoutés aux liquides de lavage paraît rentrer dans cette catégorie. Je pense qu'on peut regarder comme établi que l'iode sert de mordant pour plusieurs couleurs d'aniline (safranine, violet de gentiane, vert de méthyle, bleu Victoria). Pour ces deux dernières au moins il suffit de traiter les coupes pendant un quart d'heure, avant coloration, par de la teinture d'iode ordinaire pour voir s'augmenter beaucoup la résistance de la couleur à l'alcool de lavage. Voy. au demeurant, chapitre viii, *Safranine* et *Violet de Gentiane*.

97. Des colorations vitales. — Il a été très souvent question depuis quelques années de la propriété qu'auraient certaines substances de colorer des éléments cellulaires pendant la vie et sans porter atteinte d'une façon sérieuse à leur vitalité. Telles sont, en solutions extrêmement diluées, la quinoléine, le bleu de méthylène, le brun Bismarck, le noir d'aniline, le dahlia, le violet de gentiane, le rouge neutre (Neutralroth). Le rouge Congo est inoffensif envers certains organismes, même en solutions assez concentrées et colore certains éléments des cellules pendant la vie (Schultz, *Centralb. f. d. med. Wiss.* 1886, p. 449 ; Cf. *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 1092). On peut y colorer des Rotifères, en partie (consultez aussi à ce sujet le travail de Martinotti, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 305). Pour obtenir les résultats dont nous parlons, il faut employer des solutions colorantes très diluées et à réaction neutre ou très faiblement alcaline (les acides, même très faibles, sont presque toujours toxiques pour

Digitized by Google

les cellules). On trouve alors qu'elles teignent légèrement pendant la vie le cytoplasme de certaines cellules, jamais le noyau d'après mon expérience, ou en tout cas jamais la chromatine du noyau ; si celle-ci se colore, c'est un signe de la mort de l'élément. La coloration est tantôt répandue à travers toute la substance du cytoplasme, tantôt limitée à certains granules ou autres enclaves du cytoplasme (on a identifié ces granules avec les « bioblastes » d'ALTMANN, peut-être sans raison suffisante, voyez les *Studien über die Zelle*, 1886, et autres travaux de cet auteur). J'ai fait, depuis la publication de la 1re édition, des expériences assez étendues sur le sujet de ces prétendues colorations « vitales ». Je suis arrivé à la conclusion qu'en aucun cas il ne se produit une teinture de la matière vivante dans le sens propre de ces mots. Lorsqu'il se produit la coloration diffuse dont j'ai parlé plus haut on trouvera toujours, si la cellule est restée bien vivante, qu'il ne s'agit pas d'une teinture proprement dite, mais d'une simple absorption ou imbibition de la solution colorée par la cellule. Si l'on transporte la cellule dans un milieu privé de la matière colorante, elle abandonnera telle quelle la couleur qu'elle avait absorbée, et qui n'avait donc subi pendant son séjour dans la cellule aucun changement chimique mais était restée simplement engagée d'une façon mécanique dans les interstices de sa substance. Si au contraire il se produit une coloration des granules ou autres enclaves dont j'ai parlé plus haut, il se peut bien que cette coloration soit quelquefois une véritable teinture (elle ne l'est certainement pas toujours, ce qui se laisse démontrer en remettant la cellule dans un milieu non coloré et en constatant la disparition de la couleur). Mais en ce cas, s'il y a eu teinture véritable, on pourra toujours se convaincre que cette teinture est limitée à des enclaves, c'est-à-dire à des éléments ne faisant pas partie de la trame vivante de la cellule. Ce seront des granules de substances venues du dehors et en train d'être assimilées, du *pabulum* cellulaire, ou des produits kataboliques, des matériaux de rebut, ou bien encore des parties de la cellule qui ont subi plus ou moins l'action toxique de la solution colorante et se trouvent en état de vitalité amoindrie sinon éteinte ; en aucun cas, ce ne sera de la matière pleinement et parfaitement vivante. Je pense en somme que la valeur scientifique principale de ces colorations se trouvera dans le fait qu'elles nous fournissent un moyen de distinguer dans une cellule les éléments vitaux de ceux qui ne le sont pas, ou le sont à un degré moindre. Ces conclusions sont aussi celles de l'excellent travail de GALEOTTI, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 172. Ce travail, dont je recommande beaucoup la lecture, apporte à l'appui de la thèse une abondance de

Digitized by Google

preuves que je ne puis songer à donner dans l'espace très limité de ce paragraphe.

Aux numéros 181 et 182 se trouvent des observations qui se rapportent à ce sujet.

Tout en étant d'avis qu'il n'existe pas de colorations « vitales », proprement dites, je me hâte cependant de dire que l'emploi de solutions colorées inoffensives dans l'étude des cellules vivantes est souvent d'une utilité réelle. On trouvera souvent avantage à broyer un peu de gentiane, de dahlia, de brun Bismarck ou de bleu de méthylène dans un liquide « indifférent » et à s'en servir pour l'observation de cellules des tissus. Le bleu de méthylène offre l'avantage d'être amplement soluble dans l'eau de mer, ce qui permet de l'employer pour l'étude d'organismes marins. La gentiane et le dahlia ne sont pas suffisamment solubles dans l'eau salée pure, mais j'ai trouvé qu'ils le deviennent si l'on y ajoute une trace d'hydrate de chloral (0,25 p. 100 suffit amplement). Au chapitre des *Infusoires* nous parlerons de l'emploi de la quinoléine et du brun Bismarck. La coloration du brun Bismarck peut être fixée dans les cellules au moyen d'acide chromique à 0,2 p. 100 ou de solution de sublimé (Mayer). Le bleu de méthylène fera l'objet d'un chapitre spécial (chap. IX).

98. Choix d'une teinture. — Les quelques conseils qui suivent sont à l'usage des commençants seulement.

A. Pour les objets qui doivent être *colorés en entier*, nous recommandons en premier lieu le *carmin au borax alcoolique* de Grenacher. C'est un réactif qui, pour les travaux ordinaires d'anatomie microscopique, rend de grands services. C'est un colorant des plus énergiques et des plus précis, et le plus facile de tous à employer. On y pourra substituer, selon les cas, le *Paracarmin* de Mayer. Ce colorant me paraît être un réactif plus délicat, mais qui demandera souvent la possession de plus de jugement de la part de l'opérateur.

Pour les objets petits et facilement pénétrables, le *carmin à l'alun* (en comprenant sous ce titre les formules de Grenacher et de Partsch et le *Carmalun* de Mayer, réussit très bien. Le carmin à l'alun est la plus délicatement élective de toutes les teintures faites de couleurs stables et employées pour la méthode de coloration progressive. Malheureusement c'est une teinture aqueuse, ce qui en limite l'application ; cependant, avec les modifications que nous indiquerons, elle peut encore servir pour la coloration de pièces assez volumineuses. Nous la recommandons particulièrement. Pour les objets fixés par les sels de chrome, nous recommandons, outre ces teintures

Digitized by Google

qui avec ces objets ne donnent pas toujours les résultats voulus, les colorants à l'hématéine, soit l'*Hémalun* ou l'*Hémacalcium* de MAYER.

B. Pour la *coloration de coupes*, outre l'Hémalun, nous recommandons la *safranine* ou le *violet de gentiane*, si l'on n'a besoin que d'une coloration nucléaire. Si l'on veut en même temps une coloration plasmatique, je conseille avant toutes autres la combinaison de *Kernschwarz* suivi de *safranine* (voy. ces mots). Comme colorant plasmatique diffus, nous recommandons l'*acide picrique*, qu'on peut employer en coloration double avec l'un ou l'autre des réactifs que nous avons cités, et qui rend des services en mettant en évidence le cytoplasme des cellules. Ce procédé n'est pas à comparer comme résultats à ceux du Kernschwarz suivi de safranine ou des autres combinaisons connues, que nous apprécierons au chapitre des *Colorations combinées*, mais il a l'avantage d'être d'une simplicité élémentaire. Pour les objets *frais et dissociés*, nous recommandons le *vert de méthyle*. Il est bien certainement le réactif le plus absolument précis que nous connaissions pour la coloration de la nucléine par teinture progressive. C'est le réactif par excellence des cytologistes. Malheureusement le vert de méthyle est une couleur fugitive, très difficile à monter au baume, et pour cette raison nous ne le recommandons pas pour les travaux ordinaires d'anatomie microscopique.

99. Produits chimiques tinctoriaux. — Dans la plupart des procédés de coloration histologique il est important de travailler avec des produits chimiques purs. Cela est particulièrement essentiel pour les teintures aux *couleurs de la houille*. Pour celles-ci, *il ne suffit pas* de se procurer un produit portant le même nom qu'un produit qui a été décrit comme donnant tels ou tels résultats histologiques. Il faut que ce soit *la même marque de la même fabrique* qui a été employée par l'auteur qui l'a recommandée. Des produits portant le même nom, mais fournis par des maisons diverses, donnent très souvent des résultats tout à fait différents. (Voy. au paragraphe SAFRANINE ce qui est dit sur les différentes marques commerciales de cette substance.) Les auteurs les plus consciencieux indiquent en général la source originelle des produits qu'ils recommandent, et l'on peut se les procurer soit en s'adressant directement à la maison d'origine, soit par l'intermédiaire d'un fournisseur connu de réactifs pour microscopie. Si l'on choisit cette dernière voie, il est bon de demander l'envoi dans l'emballage originel, avec date, ceci pour garantir une fraîcheur suffisante des substances, plusieurs d'entre elles ne se conservant pas indéfiniment.

Digitized by Google

Je recommande particulièrement comme fournisseur la maison Dr G. Grübler and Co, 63, Bayersche Strasse, Leipzig. Cette maison a la spécialité de réactifs histologiques *vérifiés* et ne livre que des couleurs qui ont bien fourni à l'essai la teinture désirée. La maison livre également des liquides colorants ou fixateurs, masses d'inclusion ou d'injection, etc., préparés selon les formules classiques. Je recommande beaucoup ces produits, qui sont en général supérieurs à ceux que les histologistes préparent eux-mêmes. On peut les commander d'après le prix courant, ou simplement en citant les numéros des formules de ce livre.

Une autre maison allemande de confiance est celle du Dr G. Münder, Mikroskopisch-chemisches Institut, Göttingen.

Le lecteur connaitra sans doute des maisons françaises de confiance pour les réactifs chimiques ordinaires. J'ai tenu ici à insister sur ce que, pour les teintures histologiques aux *couleurs d'aniline*, il est absolument nécessaire, pour les procédés classiques, que les couleurs employées proviennent en dernier lieu des sources indiquées par les auteurs, lesquelles sont presque toutes des fabriques allemandes.

Digitized by Google

CHAPITRE VII

CARMIN ET COCHENILLE[1]

100. Théorie des teintures au carmin. — Les considérations suivantes sont prises dans l'important mémoire de PAUL MAYER, *Ueber das Färben mit Carmin, Cochenille und Haematëin-Thonerde*, dans *Mitth. a. d. Zool. Stat. zu Neapel*, X, Hft 3, p. 480. Les principes de la teinture histologique au carmin ont été jusqu'à présent obscurcis par l'idée erronée que le carmin ne serait que de l'acide carminique avec au plus quelques impuretés. Or il n'en est pas ainsi. D'après l'analyse de LIEBERMANN (*Ber. d. chem. Ges.*, Jahrg. 18, 1886, p. 1969-1975), le carmin serait un très remarquable *composé alumino-calcio-protéique de l'acide carminique*, véritable composé chimique, duquel en tout cas l'*aluminium* et le *calcium* ne peuvent pas plus être absents que le sodium du sel de cuisine. Son analyse donne environ 17 p. 100 d'eau, 20 p. 100 de matières azotées, 56 p. 100 d'acide carminique, au moins 3 p. 100 d'alumine et 3 p. 100 de chaux, avec une faible proportion de magnésie, de potasse, de soude, d'acide phosphorique, et une trace de cire. Les expériences de MAYER l'ont conduit à la conclusion que dans la teinture *histologique* (il ne s'agit pas ici de teinture industrielle) les éléments actifs de ce composé sont en général seulement l'acide carminique et l'alumine, avec, en certains cas particuliers, la chaux. Les autres bases sont inactives; et les matières azotées, si tant est qu'elles agissent, ont un effet nuisible, car c'est à leur présence qu'est due la putrescibilité des solutions.

Ces conclusions une fois établies, il est tout à fait logique d'admettre *qu'il convient de prendre comme base de nos teintures, non le car-*

[1] Nous avons beaucoup d'obligation à M. le Dr PAUL MAYER, qui a bien voulu lire et critiquer ce chapitre, ainsi que le précédent et le suivant.

Digitized by Google

min, mais l'acide carminique. Cette proposition avait déjà été faite par DIMMOCK (*Amer. Natural.*, XVIII, 1884, p. 324-7). Mais la tentative de DIMMOCK n'avait pas réussi, pour ce motif, que dans la composition de ses teintures, il avait omis l'*élément essentiel*, l'*alumine*. Il colorait, par exemple, avec des solutions alcooliques d'acide carminique pur, ou de carminate d'ammoniaque pur. De telles solutions colorent, il est vrai, mais faiblement et d'une manière diffuse. MAYER a donc cherché la manière de les combiner avec l'alumine.

L'acide carminique est une substance solide d'un brun pourpre, facilement soluble dans l'eau et dans l'alcool. D'après NIETZKI, *Chemie der organischen Farbstoffe*, 1889, p. 231-234, c'est un acide dit basique faible (LIEBERMANN dit *fort*), formant avec les métaux alcalins des sels solubles, avec les métaux terreux et lourds des sels violets insolubles.

Le sel aluminique (carminate d'alumine) s'obtient en précipitant une solution d'acide carminique ou de carminate d'ammoniaque par de l'acétate d'alumine. Il a la propriété remarquable d'être soluble en même temps dans les acides et les sels acides, tels que l'alun, et dans les alcalis et les sels alcalins, tels que le borax, à condition qu'on ne prenne comme dissolvant que l'eau ou de l'alcool allongé d'eau.

Il se laisse précipiter également de ces solutions par le chlorure d'aluminium, mais seulement en partie ; l'alun ne donne pas lieu à un précipité, il se forme du carminate qui reste en solution. De là, la composition de la teinture décrite plus loin sous le titre de CARMALUN.

Nous avons dit que les solutions se précipitent en partie par le chlorure d'alumine. Le carminate ainsi précipité se redissout dans un excès de chlorure, ajouté avec précaution. Cette opération fournit la teinture décrite au numéro 105, teinture qui trouvera son utilité pour les cas où il est désirable de ne pas employer un liquide contenant de l'alun.

L'une et l'autre de ces teintures colorent en un ton violet assez semblable à celui du carmin à l'alun de Grenacher. On peut obtenir un ton plus rouge en ajoutant du chlorure de calcium à la solution de Carmalun. Mais cela n'est pas à conseiller, car l'addition de chlorure de calcium précipite la solution en formant du gypse. L'addition de chlorure de calcium ne précipite naturellement pas la solution au chlorure d'aluminium; mais pour d'autres motifs on n'obtient pas de bons résultats en additionnant ainsi la solution de chlorure d'aluminium dont nous avons parlé jusqu'ici. On arrive au but en additionnant de chlorure de calcium une solution *alcoolique* de

Digitized by Google

chlorure d'aluminium. De cette façon on obtient une teinture *alcoolique* donnant une coloration *rouge*. Ce liquide sera étudié plus loin sous le titre de PARACARMIN.

Il sera intéressant de comparer ces considérations théoriques sur les teintures à l'acide carminique avec ce qui sera dit plus loin (n° 124) sur la théorie des teintures à l'hématoxyline. On y remarquera un certain parallélisme instructif. Dans les deux cas, ce n'est pas la matière colorante *seule* qui agit, c'est toujours cette matière associée à l'*alumine*.

La teinture s'obtient toujours au moyen de l'acide carminique plus l'alumine ou au moyen de l'hématéine plus l'alumine ; d'autres substances, telles que la chaux, jouant rarement un rôle dans la teinture.

101. Théorie des teintures à la cochenille. — D'après MAYER, dont les plus anciennes recherches sur cette matière se trouvent confirmées par ses études les plus récentes (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, 3, 1892, p. 496), le principe actif des extraits ou teintures histologiques de cochenille n'est pas l'acide carminique libre, mais un composé de cet acide avec une base, laquelle n'est pas la chaux mais un alcali. L'extrait aqueux de cochenille ne contient que des traces de chaux, l'extrait alcoolique n'en renferme pas même des traces. L'extrait aqueux, préparé au moyen de l'*alun* (soit cochenille de Partsch ou de Czokor), doit ses propriétés tinctoriales à la formation d'un *carminate d'alumine*, sel dont les propriétés générales ont été discutées dans le paragraphe précédent. La teinture préparée avec l'*alcool pur* ne contient au contraire que *ce carminate d'un alcali* que nous avons mentionné tout à l'heure. Ce carminate *seul* colore d'une façon faible et diffuse, comme le fait l'acide carminique seul. Mais s'il se rencontre, dans les tissus à teindre, avec des sels de chaux, d'alumine ou de magnésie qui soient capables d'entrer en combinaison avec lui et de fournir au sein des tissus des précipités colorés insolubles, alors il peut résulter une coloration énergique et très élective. En effet, l'*ancienne teinture alcoolique simple* de MAYER donne des colorations superbes avec certains objets, c'est-à-dire avec ceux qui contiennent les sels en question. Malheureusement les objets ainsi constitués sont plutôt rares, et avec la plupart des objets histologiques la coloration fournie par cette teinture est assez pâle.

Or MAYER a trouvé qu'en ajoutant les sels en question à la teinture on obtient une solution colorante qui contient elle-même tous les éléments nécessaires pour fournir une coloration forte et élective avec toutes sortes d'objets. D'où la *nouvelle formule*, n° 120.

Digitized by Google

102. Acide carminique pur.—On peut se le procurer chez E. MERCK à Darmstadt, ou chez Grübler (adr. dans le chap. précédent). Le prix (variable) est dans les environs de 2 fr. 50 à 5 fr. par 10 grammes. M. le Dr Mayer m'écrit du reste que la qualité laisse souvent à désirer ; des échantillons récemment fournis se sont trouvés contenir souvent un peu d'ammoniaque ou d'alcali fixe.

103. Choix d'une teinture au carmin. — Dans mon opinion, l'utilité essentielle des teintures au carmin se trouve dans leurs excellentes qualités pour les colorations d'*objets entiers*. Pour les coupes, je les trouve décidément inférieures aux anilines classiques et à plusieurs teintures à l'hématéine. On peut donc rejeter toutes les anciennes formules proposées pour la coloration de coupes. Pour les autres, il y a lieu de croire que les formules de MAYER viendront sous peu, en vertu de leur rationalité et de l'égalité constante des produits qu'elles fournissent, à prendre la place de bien des teintures jusqu'ici fort estimées. Ce ne sera peut-être pas tant en vertu d'une supériorité absolue des liquides de Mayer au point de vue de la précision ou de l'énergie de la *coloration*, que pour d'autres motifs. Je n'ai pas pu trouver (Mayer du reste ne l'a jamais affirmé) que le Paracarmin soit toujours supérieur au carmin boracique sous ces rapports, bien qu'il fournisse certainement souvent une coloration plus fine. Le carmalun m'a donné des colorations égales en beauté et en précision à celles du carmin aluné, mais pas supérieures. Les deux liquides de Mayer ont cependant d'autres points de supériorité que nous énumérerons dans leurs paragraphes respectifs. Je pense que, s'il n'était un peu coûteux, le Carmalun pourrait remplacer avec avantage le carmin aluné dans les laboratoires, mais que pour le moment il faudra maintenir le carmin boracique à côté du Paracarmin.

En tout cas, il y a lieu d'espérer que les démonstrations de MAYER auront réussi à barrer le flot de formules irrationnelles pour teintures au carmin qui nous a si longtemps assiégés.

TEINTURES AQUEUSES

a. *Solutions acides* [1].

104. Carmalun (MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, 3, 1892, p. 489). — Acide carminique, 1 gr. ; alun, 10 gr. ; eau distillée,

[1] Les solutions aluniques qui vont suivre doivent être évitées pour les objets qui contiennent des éléments *calcaires*.

Digitized by Google

200 cc. Faire dissoudre à l'aide de la chaleur [1]; décanter ou filtrer. Il faut ajouter un antiseptique, soit quelques cristaux de thymol, ou 1 p. 1000 d'acide salicylique ou enfin 5 p. 1000 de salicylate de soude.

Liquide d'un rouge clair, d'un ton violacé. Il colore bien les pièces volumineuses, même après traitement par les solutions osmiques. On peut laver à l'eau distillée, mais en ce cas le plasma demeurera un peu coloré. Si l'on désire éviter cela, il faut laver, avec précaution, dans une solution d'alun, ou dans des cas difficiles, avec un acide très faible. L'effet général est celui d'une coloration au carmin aluné. La différence principale, c'est que le Carmalun est très approprié aux *colorations en masse* de pièces assez volumineuses, besogne pour laquelle le carmin à l'alun n'est pas très adapté si l'on s'en sert sans autres précautions (mais voyez au n° 107).

On peut faire une solution moins forte en prenant de 2 à 3 fois autant d'alun et 5 fois autant d'eau et faisant dissoudre à froid. On obtient une solution qui ressemble peut-être encore plus au carmin aluné, mais qui colore cependant en un ton un peu plus rouge. Cette teinture me parait bien un peu faible pour le travail ordinaire.

Il faut bien observer qu'avec l'une ou l'autre de ces solutions les tissus à colorer *ne doivent pas avoir une réaction alcaline.*

Les autres propriétés de ces solutions sont très semblables à celles du carmin aluné (voyez § 106).

105. Solution au chlorure d'aluminium (MAYER, *ibid.*, p. 490). — Acide carminique, 1 gr.; chlorure d'aluminium, 3 gr.; eau, 200 cc. Ajouter un antiseptique, comme pour le Carmalun.

Emploi comme pour le Carmalun. La coloration est d'un violet bleu, énergique et élective; le plasma cependant s'y colore un peu plus fortement qu'avec le Carmalun. MAYER recommande cette teinture *seulement à titre de succédané du Carmalun*, pour les cas où celui-ci serait contre-indiqué à cause de l'alun qu'il contient, ou pour un autre motif semblable.

106. Carmin à l'alun; Carmin aluné; Carmin alunique (GRENACHER, *Arch. f. mik. Anat.*, XVI, 1879, p. 465). — A une solution aqueuse d'alun de potasse ou d'ammoniaque, d'une concentration de 1 à 5 p. 100, ou de toute autre concentration qu'on préfère, on ajoute 0,5 à 1 p. 100 de carmin en poudre, et l'on fait bouillir pendant dix à vingt minutes. Il vaut peut-être mieux se servir d'une solution d'alun très concentrée, et, après l'avoir fait bouillir avec le carmin, l'allonger au degré voulu. Après refroidissement, filtrer. (Nous avons l'habitude d'ajouter à notre solution un peu d'acide phé-

[1] J'ai pu facilement faire mes solutions à froid.

Digitized by Google

nique ou un cristal de thymol pour prévenir le développement de moisissures.).

Nous avons déjà dit que le carmin à l'alun est, de tous les carmins, le réactif le plus délicat dans ses résultats. C'est un colorant nucléaire presque absolument pur. En dehors de la chromatine des noyaux, il n'y a guère que les nucléoles et la substance contractile des muscles striés qui s'y colorent. Ce carmin présente le grand avantage qu'on peut laisser les préparations indéfiniment dans les solutions sans crainte de voir se produire des surcolorations. Les colorations sont stables dans le baume et dans la glycérine neutre; elles le sont moins dans la glycérine acidulée.

Il ne faut pas employer ce colorant pour des objets contenant des éléments calcaires qu'on désire conserver.

Cette teinture a deux défauts : elle colore lentement, et pénètre assez mal. Ce dernier inconvénient peut être écarté par l'emploi du procédé de Henneguy, que nous allons donner.

Des modifications de cette formule, qui nous paraissent peu utiles, ont été proposées par TIZZONI. (*Bull. Sc. Med. Bologna*, 1884, p. 259 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 730) ; PISENTI (*Gazetta degli Ospetali*, n° 24, 1885 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 376); et GRIEB (*Mem. Soc. Ital. Sci.*, t. VI, n° 9, 1887 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 1, 1890, p. 47.)

107. Carmin aluné à l'acide acétique (HENNEGUY). — On fait bouillir du carmin en excès dans une solution saturée d'alun de potasse. Après refroidissement, on ajoute 10 p. 100 d'acide acétique cristallisable, et on laisse reposer le mélange pendant plusieurs jours. Il se fait un dépôt de carmin et d'alun ; on filtre.

Pour colorer les pièces, on les met dans l'eau distillée, à laquelle on ajoute quelques gouttes de la solution de carmin, de manière à obtenir une teinte rose foncée. Elles restent dans la teinture vingt-quatre à quarante-huit heures, selon leur nature ; puis on les lave pendant une heure ou deux dans de l'eau distillée. Il importe d'employer de l'eau distillée, pour éviter la formation de cristaux dans les pièces. On traite ensuite par l'alcool à la manière ordinaire.

L'avantage de ce carmin est d'avoir un *pouvoir pénétrant* très grand et de colorer également toutes les parties aussi bien profondes que superficielles. Il a l'inconvénient de donner une coloration lilas qui n'est pas agréable à l'œil ; mais on peut rendre la coloration plus rouge en plaçant les pièces lavées dans de l'alcool additionné d'acide chlorhydrique, comme lorsqu'on emploie le carmin au borax.

Les préparations se conservent très bien dans le baume, moins bien dans la glycérine.

Digitized by Google

Une autre manière d'employer le carmin aluné pour la coloration de pièces volumineuses est celle qui m'a été communiquée par ZOLTAN VON ROBOZ (solution très allongée de carmin aluné additionnée de quelques gouttes de solution faible d'acide osmique).

Ce procédé donne des colorations superbes, mais j'en supprime les détails, parce qu'il est assez difficile à régler avec exactitude, et parce qu'on arrive à peu près aux mêmes résultats, et avec une complète certitude, par le Carmalun, ou par le procédé de Henneguy.

108. Cochenille à l'alun (PARTSCH, *Arch. f. mik. Anat.*, XIV, 1877, p. 100). — Faire bouillir de la cochenille avec une solution d'alun à 5 p. 100, filtrer, et ajouter un peu d'acide salicylique pour prévenir le développement de moisissures.

Une autre formule a été donnée par CZOKOR (*Arch. f. mik. Anat.*, XVIII, 1880, p. 413).

Les deux formules de PARTSCH et de CZOKOR ont été soigneusement étudiées par PAUL MAYER (*Mitth. Stat. Zool. Neapel.*, X, 3, 1892, p. 496), qui trouve que celle de PARTSCH est la plus rationnelle. Elle contient la bonne proportion d'alun, tandis que la formule de CZOKOR n'en contient pas assez. Aussi la solution de PARTSCH se conserve mieux ; celle de CZOKOR précipite volontiers.

Le mode de préparation conseillé par RABL, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 168, n'est qu'une modification insignifiante de celui de Czokor.

Ces deux formules fournissent une teinture de la plus haute précision. La chromatine des noyaux se colore en bleu, d'autres éléments prennent des teintes rouges diverses, ce qui produit l'effet d'une coloration double. Ces solutions colorent en un temps plus ou moins long des tissus qui ont subi n'importe quel genre de préparation préalable. Des tissus préparés par l'alcool se colorent en trois à quatre minutes; ceux qui ont été préparés par l'acide chromique demandent trois à cinq heures.

Ces solutions sont peut-être supérieures comme richesse de coloration au carmin à l'alun. Nous ne saurions dire si les colorations sont également stables. Il faut en tout cas éviter les milieux acides, et monter dans la glycérine neutre ou, ce qui est mieux, dans le baume.

109. Carmins picro-alunés. — Les préparations faites au carmin aluné peuvent être traitées après coup par l'acide picrique, et fournir ainsi des colorations doubles qui sont quelquefois très utiles. LEGAL combine les deux teintures, en raison de dix volumes de carmin à l'alun et un volume de solution saturée d'acide picrique (*Morphol. Jahrb.*, VIII Bd., p. 353.) On peut en agir ainsi avec n'importe lequel des carmins alunés que nous venons de passer en revue. Les résultats sont quelquefois fort beaux.

Digitized by Google

110. Carmin acétique (SCHNEIDER, *Zool. Anzeig.*, 1880, p. 254). — On fait bouillir une solution d'acide acétique d'une concentration de 45 p. 100, et l'on ajoute du carmin jusqu'à ce qu'il ne s'en dissolve plus ; puis on filtre. (C'est, à ce que dit Schneider, à la concentration de 45 p. 100 que l'acide acétique dissout la plus grande proportion de carmin.)

Pour s'en servir, on peut ajouter une goutte de la solution concentrée à des objets frais placés sur le porte-objets : c'est la méthode dont Flemming s'est servi dans ses importantes recherches sur la fécondation de l'œuf des Echinides. Ou bien on peut se servir d'une solution diluée à 1 p. 100, pour la coloration lente.

Ce réactif a ceci de particulier, qu'il *fixe* en même temps qu'il colore. La solution est extrêmement pénétrante, *fixe* bien pour un certain temps (mais seulement pour un certain temps) et peut ainsi servir pour l'étude d'objets frais. Coloration nucléaire. Malheureusement les préparations ne se conservent pas.

Ce carmin a rendu des services autrefois comme *fixateur colorant*. Je pense qu'aujourd'hui il vaut infiniment mieux s'adresser pour cela au vert de méthyle acide.

110 *bis*. Carmin acéto-ferrique de Zacharias (*Zool. Anz.*, n° 440, 1894, p. 62).

Acide acétique dil. à 3 p. 100	150 à 200 gr.
Carmin	1 —

Faire bouillir en remuant continuellement pendant 20 minutes, laisser refroidir et filtrer plusieurs fois. Colorer pendant plusieurs heures, 6 à 24 ou plus. Rincer à l'acide acétique dilué, et mettre (il faut éviter de toucher les objets avec des instruments métalliques) dans une solution à 1 p. 100 de citrate de fer ammoniacal (c'est bien le *Ferri et Ammoniæ Citras* des pharmacies). On peut y laisser les objets jusqu'à 2 ou 3 heures. Ils y prennent une teinte noire (pour les coupes, c'est une teinte grise, qui arrive déjà au bout de quelques minutes). Il ne faut pas prolonger le séjour dans la solution de sel de fer au delà du temps nécessaire, car les surcolorations sont à craindre. On lave pendant plusieurs heures à l'eau distillée, on déshydrate, on éclaircit (Zacharias se sert pour cela de créosote), et on monte au baume.

Après essai, je pense que cette méthode pourra bien rendre des services dans certains cas. L'effet général est plutôt celui du Kernschwarz que de l'hématoxyline, à laquelle Zacharias a comparé son colorant. La chromatine est bleuâtre (franchement bleue à l'état kinétique), les éléments plasmatiques brunâtres. J'engage l'observateur à ne pas se laisser rebuter par l'aspect peu esthétique des préparations. On observera que ce procédé a l'avantage de pouvoir s'appliquer à la coloration d'*objets entiers*. (M. le Dr Paul MAYER me fait observer qu'il faut que les objets soient *petits*, sans cela le sel de fer envahit tout.)

Digitized by Google

Au point de vue surtout de la *coloration plasmatique*, j'estime que c'est une méthode sérieuse. Je n'en connais guère qui démontrent aussi bien les fuseaux karyokinétiques.

Comme me l'a fait observer M. le Dr Paul MAYER, on obtient le même effet en traitant par le sel de fer après coloration par le Carmalun. Après un essai comparatif des deux carmins, je pense que celui de Zacharias est superflu, mais que son procédé constitue une manière de faire virer les préparations au Carmalun qui peut souvent avoir son utilité pour l'étude des éléments plasmatiques.

b. *Solutions alcalines ou neutralisées.*

111. Le « picro-carminate d'ammoniaque », ou **picro-carmin** est un réactif qui possède certaines qualités importantes. Il ne nuit guère aux tissus les plus délicats ; et, quand il est bien préparé, il donne des colorations assez précises. Malheureusement la préparation en est toujours incertaine, à cause de la difficulté que présentent le dosage des ingrédients et la détermination du point exact de neutralisation. Les solutions sont passablement stables[1] ; et les colorations sont parfaitement permanentes, soit dans le baume, soit dans la glycérine, à condition cependant que la glycérine soit acidulée avec 1 p. 100 environ d'acide acétique, ou d'acide formique (ce qui est mieux).

Dans une bonne préparation au picro-carmin, les noyaux doivent être d'un beau rouge, le cytoplasme orange. On peut facilement corriger les surcolorations ou les colorations diffuses en lavant à l'acide chlorhydrique. On peut prendre à cette fin le mélange d'acide chlorhydrique et d'alcool dont on se sert pour décolorer les pièces qui ont été colorées par le carmin au borax ; ou bien on peut avec avantage employer un mélange de glycérine et de HCl (jusqu'à 0,5 p. 100).

Ce n'est point selon nous dans la coloration double que fournit le picro-carmin qu'il faut voir la valeur essentielle de ce réactif. C'est plutôt en ce qu'il est assez inoffensif pour les cellules, et en conserve bien les formes, tout en donnant lieu à une légère macération. Il est souvent fort utile pour produire en même temps la macération et la coloration. Grâce à l'action conservatrice de l'acide picrique, on peut souvent laisser les pièces fort longtemps dans la teinture sans inconvénient.

J'ai essayé bon nombre des formules de préparation citées ci-dessous. Aucune ne m'a paru avoir des avantages réels sur les autres.

112. Picro-carmin (RANVIER, *Traité technique d'Histologie*, p. 100). — Dans une solution saturée d'acide picrique, on verse du carmin dissous dans l'ammoniaque, jusqu'à saturation ; puis on évapore dans une étuve. Après réduction des quatre cinquièmes, la liqueur refroidie abandonne un dépôt, peu riche en carmin, qui est séparé par filtration. Les eaux mères

[1] Il est cependant bon d'y ajouter un antiseptique pour prévenir le développement de moisissures. On peut employer à cet effet l'hydrate de chloral (1 p. 100), ou l'acide phénique.

Digitized by Google

évaporées donnent le picro-carminate solide sous la forme d'une poudre cristalline de la couleur de l'ocre rouge. Cette poudre doit se dissoudre entièrement dans l'eau distillée ; une solution au centième est la plus convenable.

Ce mode de préparation ne donnant nullement toujours un produit constant, VIGNAL recommande le suivant :

113. Picro-carmin. *Mode de préparation employé dans le laboratoire d'Histologie du Collège de France.* — Nous devons la formule suivante à l'obligeance de M. VIGNAL :

Eau	1,000
Acide picrique	20
Carmin	10
Ammoniaque	50

Mettre dans un flacon bouché et laisser pendant deux ou trois mois dans un endroit chaud. Puis laisser pourrir dans un grand cristallisoir ; lorsque le liquide est évaporé jusqu'à ne plus occuper que les 4/5 du volume primitif, enlever les cristaux d'acide picrique qui sont au fond du vase. Laisser sécher, puis dissoudre dans un peu d'eau chaude. Filtrer et examiner au microscope si le carmin est bien dissous. Dans le cas où il ne l'est pas, ajouter de l'eau et de l'ammoniaque et laisser pourrir de nouveau ; puis refaire la même opération que précédemment.

Lorsque le carmin est combiné, faire sécher la liqueur à l'étuve et la réduire en poudre.

Un gramme de poudre dissous à chaud dans 100 grammes d'eau donne le picro-carmin. On y ajoute un petit cristal de thymol au moment où l'on fait dissoudre la poudre, pour éviter le développement des moisissures.

114. Autres formules pour la préparation du picro-carmin. WEIGERT, *Virchow's Archiv.*, LXXXIV, p. 275, 315 (très aléatoire). GAGE, *Am. Mon. Mic. Journ.*, I, 1880, p. 22 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, III, p. 501 (compliqué, et ne m'a pas fourni un produit soluble). FOL, *Lehrbuch*, p. 195. RUTHERFORD, *Pract. Hist.*, p. 173. MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, II, p. 20. BABER, *Mon. Mic. Journ.*, XII, p. 48. PERGENS, *Biologie cellulaire* de CARNOY, p. 92. HOYER, *Biol. Centralb.*, II, 1882, p. 17. BIZZOZERO, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 539. KLEMENSIEWICS, *Sitzb. Akad. Wiss. Wien*, LXXVIII, 1878, III, JUNI ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 501. CUCCATI, ibid., VI, I, 1889, p. 42. (Picro-carmin à la soude) LOEWENTHAL, *Anat. Anz.*, II, 1887, p. 22, et *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 313. Anonyme, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 518. SQUIRE, *Methods and Formulæ*, etc., 1892, p. 35.

115. Carmin au lithium (ORTH, *Berliner klin. Wochensch*, 28, 1883, p. 421). — Superflu. Macère du reste considérablement (MAYER).

116. Carmin à l'ammoniaque. — Je regarde le carmin à l'ammoniaque dans toutes les modifications qui ont été proposées comme entièrement suranné, si ce n'est pour l'emploi unique de la coloration des coupes des centres nerveux (voir à la deuxième partie), ou bien de tissus macérés au point de ne plus tolérer, sans se ratatiner, des corps comme l'alun, l'alcool,

Digitized by Google

etc. (MAYER). Voyez au besoin BEALE, *How to work*, etc.. 4e éd., p. 109-304. BETZ, *Arch. f. mik. Anat.*, IX, 1873, p. 112. BÖHN (pas BOHM), *Arch. Anat. u. Phys.*, *Anat. Abth.*, 1882, p. 4. FREY, *Le Microscope*, p. 167. GIERKE, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 76 (carmin pourri). Carmin acétique neutre de HAMANN., *Intern. Mon. f. Anat. u. Hist.*, I, 1884, p. 346 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 87. HEIDENHAIN, *Arch. f. mik. Anat.*, VI, 1870, p. 402. HOYER, *Biol. Centralb.*, II, 1882, p. 17. « Carmin neutre » de RANVIER. 1re édition de ce traité.

c. *Autres solutions aqueuses, acides ou alcalines.*

117. Carmin acide de Schweigger-Seidel, *Traité* de RANVIER, p. 99. Carmin-borax neutre, WOODWARD, *Mon. Mic. Journ.*, VII, 1872, p. 38 ; *Am. Quart. Mic. Journ.*, I, 1879, p. 220 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, II, p. 613 ; de GRENACHER, *Arch. f. mik Anat.*, XVI, 1879, p. 466 ; des modifications de cette formule par HAUG, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 151, et VIII, I, 1891, p. 52 ; de GIBBES, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, III, 1883, p. 390 ; de NIKIFOROW, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 337. Carmin à l'acide osmique de DELAGE, *Arch. de Zool. exp. et gén.*, IV. sér. 2, 1886. Carminroth de ROLLETT, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 91. Carmin soluble de PERLS, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 91. Acide carminique, DIMMOCK, *Amer. Natural.*, XVIII, 1884, p. 324, et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1884, p. 471. Carmin à l'acide borique, ARCANGELI, *Proc. Verb. Soc. Tosc. Sc. Nat.*, 1885, p. 283 et *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 377. Carmin à l'acide salicylique, ARCANGELI, *ibid.* Carmin à l'acide picrique, ARCANGELI, *ibid.* MINOT, *Methods in mic. Anat.* de Whitman, p. 42. Carmin à l'urane de GIERKE, *Zeit. f. wiss. mik.*, I, 1884, p. 92 ; de SCHMAUS, *ibid.* VIII, 2, 1891, p. 230. Carmin au carbonate de soude, CUCCATI, *ibid.*, IV, I, 1887, p. 50.

TEINTURES ALCOOLIQUES

118. Carmin au borax, alcoolique (GRENACHER ; *Arch. f. mik. Anat.*, XVI, 1879, p. 466 et suivante). — On fait une solution concentrée de carmin dans une solution de borax (carmin, 2 à 3 p. 100 ; borax, 4 p. 100)[1] ; on ajoute un volume égal d'alcool à 70 degrés ; on laisse reposer [2], et l'on filtre. On y laisse les préparations le temps nécessaire pour qu'elles soient pénétrées, et on les porte, sans lavage préalable, dans de l'alcool [3] contenant 4 à 6 gouttes d'acide chlorhydrique par 100 cc. On les laisse dans ce liquide jusqu'à ce qu'elles soient bien pénétrées[4], puis on les lave à l'alcool pur.

[1] Faire bouillir pendant une demi-heure ou plus (MAYER).

[2] Vingt-quatre heures (MAYER).

[3] A 70 p. 100 ; cela est absolument nécessaire (MAYER).

[4] Cette indication n'accorde pas assez de temps à la différenciation ; il faut parfois des jours entiers (MAYER).

Digitized by Google

La proportion d'alcool contenue dans cette solution suffit pour la bonne conservation de tous les objets qui ne sont pas très délicats et qui ne demandent pas une immersion très prolongée pour être imbibés. Pour les objets qui demandent par exemple une immersion de plusieurs jours au lieu de quelques heures, il y a utilité à augmenter la dose d'alcool. Nous trouvons même, pour notre part, que les solutions plus alcooliques sont, dans la plupart des cas, préférables à la solution ordinaire; la conservation des cellules est souvent sensiblement meilleure, la solution étant en même temps plus neutre et moins aqueuse; et nous croyons que la coloration est plus précise et plus facile à contrôler. On peut ajouter de l'alcool jusqu'à concurrence de 50 p. 100; en tout cas pas au delà de 60 p. 100 (MAYER).

Pour la décoloration, nous nous servons d'une solution d'acide chlorhydrique encore plus étendue, que nous avons appris à connaître dans le Laboratoire de Morphologie de l'Université de Genève; à savoir, 33 gouttes d'acide par litre d'alcool. On y laisse les objets jusqu'à ce qu'ils présentent une certaine transparence et un certain aspect brillant qui indiquent que les tissus sont suffisamment décolorés et la couleur fixée dans les noyaux.

Ce carmin peut servir à colorer des objets qui ont été fixés dans le mélange de Flemming, à condition qu'ils aient été bien lavés.

Il est certainement l'une des plus importantes de toutes les teintures histologiques. Tous les observateurs sont d'accord pour reconnaître à quel point il est d'un emploi commode.

Les colorations sont parfaitement stables dans tous les milieux conservateurs [1].

119. Paracarmin (MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, 3, 1892, p. 491). — Acide carminique, 1 gr.; chlorure d'aluminium, 0, 5 gr.; chlorure de calcium, 4 gr.; alcool, 70 p. 100 à 100 cc. Faire dissoudre au froid ou à l'aide de la chaleur, laisser déposer, et filtrer. Liquide d'un rouge clair, très propre aux colorations en masse; c'est la teinture qui se rapproche le plus du carmin au borax alcoolique de Grenacher.

Les tissus à colorer *ne doivent pas avoir une réaction* alcaline [2]. Après coloration, les coupes (ou les objets destinés à être débités en coupes) doivent être lavées à l'alcool pur à 70 p. 100. Les objets desti-

[1] Le seraient-elles dans la glycérine? (MAYER.)

[2] Ni contenir beaucoup de carbonate de chaux (spicules ou portions squelettiques calcaires des Coraux, etc.), qui donnerait lieu à des précipités. (MAYER.)

Digitized by Google

nés à être montés entiers peuvent être lavés dans une solution faible de chlorure d'aluminium dans l'alcool ; ou, si cela ne suffit pas, avec de l'acide acétique (à 5 p. 100 si on prend l'acide ordinaire, 2, 5 p. 100 si l'on prend l'acide cristallisable) dans l'alcool.

Coloration nucléaire, rouge, mais d'un rouge moins éclatant que celui du carmin au borax. Cette teinture possède les points suivants de supériorité sur le carmin au borax. Elle n'est pas alcaline, ce qui fait qu'elle est plus inoffensive au point de vue de la conservation des tissus ; elle est plus fortement alcoolisée, ce qui fait qu'elle a plus de pénétration ; elle n'a pas cette tendance qu'a le carmin au borax de former des précipités granuleux à l'intérieur de certains objets et elle se conserve parfaitement sans précipiter. Il me semble pour ma part que c'est un réactif plus fin que le carmin borax, qui a certainement ses qualités brillantes, mais qui est comparativement un peu brutal.

120. Teinture de cochenille de Mayer, *nouvelle formule* (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, 3, 1892, p. 498). — Cochenille, 5 gr. ; chlorure de calcium, 5 gr. ; chlorure d'aluminium, 0,5 gr. ; acide nitrique (d'une densité de 1,20), 8 gouttes ; alcool à 50 p. 100, 100 cc. On pulvérise finement la cochenille et on la broye intimement avec les sels en nature, on ajoute l'alcool et l'acide, on chauffe à l'ébullition, on laisse refroidir, on laisse le tout pendant quelques jours en agitant fréquemment, et l'on filtre.

Les objets doivent être saturés d'alcool à 50 p. 100 avant la coloration, et c'est dans de l'alcool de ce titre qu'il faut les laver ensuite.

Coloration assez semblable à celle du Paracarmin, mais ni aussi énergique ni aussi élective. MAYER *propose cette teinture seulement comme succédané du Paracarmin.*

Ce liquide est contre-indiqué pour des tissus contenant des éléments calcaires.

121. Teinture de cochenille de Mayer, *ancienne formule.* (Paul MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, II, 1881, p. 14.) — On fait macérer de la cochenille en poudre pendant plusieurs jours dans de l'alcool à 70 degrés. Il faut prendre environ 8 à 10 cc. d'alcool pour chaque gramme de cochenille, remuer fréquemment, puis filtrer.

Les objets à colorer doivent être imbibés d'alcool du même titre que celui qui a servi à faire la solution ; et il faut avoir soin d'employer toujours de l'alcool de ce titre pour le lavage des objets ou pour diluer la solution elle-même.

Il est très important de bien débarrasser les objets d'acide avant de les colorer. Si l'on néglige cette précaution, on n'obtient que des colorations diffuses. Les objets préparés à l'acide osmique ne se colorent que faiblement, à moins qu'on ne les ait préalablement *blanchis*. Les objets préparés à l'acide chromique se colorent bien, encore mieux ceux qui ont été fixés par un liquide picrique ou par l'alcool absolu.

Les colorations excessives ont très rarement lieu. On peut les corriger

Digitized by Google

par de l'alcool acidulé avec 1 p. 100 d'acide acétique ou 1 p. 100 d'acide chlorhydrique.

Nous avons indiqué plus haut (n° 101) les raisons pour lesquelles cette teinture ne fournit des colorations parfaitement réussies qu'avec certains objets. Pour ces motifs MAYER lui-même paraît disposé à l'abandonner entièrement en faveur de la nouvelle formule. Je l'ai conservée ici parce qu'il me semble toujours que c'est un réactif qu'il est bon de connaître. Pour celui qui étudie l'histologie des Arthropodes, j'estime que c'est un réactif indispensable. La nouvelle formule donne un liquide qui pour bien des objets est insuffisamment alcoolique. Ajoutons que l'ancienne teinture est à réaction neutre et peut être employée avec des objets calcaires. Quoi de meilleur, par exemple, pour préparer un *Pluteus?*

122. Carmin à l'acide chlorhydrique, alcoolique. — Ce carmin est assez important. Seul il permet d'obtenir une coloration à la fois énergique et rapide, par le moyen de solutions faites avec de l'*alcool très fort*, jusqu'à l'alcool absolu. Cela est précieux pour la coloration en masse d'objets très difficilement pénétrables (pièces protégées par la chitine). Ces solutions ont sur le carmin au borax l'avantage de contenir incomparablement plus de carmin dans l'alcool fort. On les emploie comme le carmin au borax, en opérant la décoloration avec le même alcool acidulé d'acide chlorhydrique. Cependant, avec une solution heureusement combinée, on peut obtenir de prime abord des colorations électives qui n'ont pas besoin de décoloration. Les colorations sont permanentes dans tous les milieux conservateurs.

a. FORMULE DE GRENACHER (*Arch. f. mik. Anat.*, XVI, 1879, p. 468). — Demande le plus souvent des opérations ennuyeuses de neutralisation.

b. FORMULE DE PAUL MAYER (GARBINI, *Manuale per la Technica moderna del microscopio*, p. 46). — Mayer prend 100 grammes d'alcool absolu (ou d'un titre plus faible), il ajoute 1 ou 2 gouttes d'acide chlorhydrique, et du carmin *à saturation*. Il faut faire bouillir jusqu'à ce que l'on obtienne une solution claire.

D'après notre expérience, celle-ci est la manière la plus sûre de préparer le carmin à l'acide chlorhydrique. Il est à remarquer qu'il doit toujours rester un *excès de carmin* dans la solution. Bien préparé, ce carmin doit donner une coloration parfaitement nucléaire, sans décoloration par l'HCl.

c. ANCIENNE FORMULE DE P. MAYER (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, IV, 1883, p. 521).

d. FORMULE PLUS RÉCENTE DE P. MAYER (*Intern. Monatschr. f. Anat. u. Phys.*, IV, 1887, p. 43). — Carmin, 4 grammes; eau, 15 cc.; acide chlorhydrique, 30 gouttes. Faire bouillir jusqu'à dissolution du carmin, ajouter 95 cc. d'alcool à 85 p. 100, et neutraliser en ajoutant de l'ammoniaque jusqu'à ce que le carmin commence à se déposer.

Cette solution donne toujours des colorations diffuses; pour les rendre électives, il faut décolorer par l'HCl.

e. FORMULE DE BRASS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 303.

Il convient d'observer que si l'on désire diluer l'une ou l'autre de ces solutions, il ne faut pas employer à cet effet de l'eau, mais de l'alcool du même titre que celui qui a servi à faire la solution.

Digitized by Google

123. Autres carmins alcooliques. — Nous ne citons que pour mémoire les solutions suivantes, qui sont toutes mauvaises ou superflues. **Carmin lilas au borax** (THIERSCH, *Arch. f. mik. Anat.*, I, 1865, p. 150). **Carmin picroboraté** (DUTILLEUL, *Bull. scient. dép. Nord*, XVI, 1885, p. 371). **Carmin sulfurique, alcoolique** (HOYER; *Arch. f. mik. Anat.*, XIII, 1876, p. 650). **Carmin à l'acide borique, alcoolique** (FRANCOTTE; *Bull. Soc. Belge micr.*, 1886, p. 48).

Digitized by Google

CHAPITRE VIII

HÉMATOXYLINE (HÉMATÉINE)

ET AUTRES COLORANTS VÉGÉTAUX

124. Théorie des teintures à l'hématéine ou à l'hématoxyline. — Il paraît maintenant parfaitement établi (NIETZKI, *Chemie der organischen Farbstoffe*, 1889, p. 215) que le principe colorant des teintures d'hématoxyline n'est pas autre chose que l'*hématéine*. De plus, il faut également admettre que l'hématéine des solutions histologiques usuelles est un produit de l'oxydation (par le moyen de l'air) de leur hématoxyline originelle (MAYER, *Ueber das Färben mit Haematoxlin*, dans *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, I, 1891, p. 170-186; puis UNNA, *Ueber die Reifung unserer Farbstoffe*, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, IV, 1892, p. 483). Le changement produit dans les solutions par cette oxydation a été connu des histologistes depuis longtemps sous le nom de « maturation » des solutions; on se rendait bien compte que, jusqu'à ce qu'il se fût produit, les solutions n'étaient pas en état de fournir des colorations ayant les qualités désirées.

Pour réaliser la « maturation » voulue, les histologistes se fiaient jadis (d'après une tradition tout empirique et indépendante de toute théorique chimique) à l'absorption spontanée de l'oxygène de l'air par les solutions d'hématoxyline. Nous devons à MAYER et à UNNA la découverte importante qu'il n'y a rien de plus facile que de réaliser cette réaction d'une manière artificielle. Il suffit, par exemple, d'ajouter à une solution alunique d'hématoxyline une faible quantité de solution neutralisée de peroxyde d'hydrogène. La solution hématoxylique « mûrit » instantanément, virant à un bleu foncé, et se trouve dès l'instant dans l'état de maturité voulue pour les colorations.

Il faut donc admettre que l'*hématéine* est toujours l'élément essentiel par excellence de nos solutions. Faut-il également admettre que

Digitized by Google

cet élément seul suffirait? Les recherches de MAYER (*loc. cit.*) ont démontré qu'il ne suffirait pas. Une solution d'hématéine pure et libre ne fournirait pas une coloration *élective* semblable à nos colorations histologiques ; elle ne saurait fournir au plus qu'une teinture plate et confuse de tous les éléments, teinture faible et sans relief et par conséquent pas du tout bonne. Si nous faisons abstraction pour le moment de certains procédés de coloration au moyen des laques chromiques ou ferriques d'hématoxyline (WEIGERT, HEIDENHAIN), nous trouvons que les teintures histologiques usuelles se font toutes au moyen de solutions contenant de l'*alun*. MAYER a conclu que le principe actif de ces solutions est un composé d'hématéine et d'alumine, un véritable sel.

Il suppose que ce sel se laisse précipiter au sein des tissus (surtout dans les noyaux), par certains sels organiques et inorganiques des tissus (des phosphates, par exemple) ; peut-être aussi par d'autres corps organiques appartenant aux tissus. Nous savons que ces sels existent dans les tissus vivants. Par nos procédés de « fixation » histologique, ils y sont fixés, soit dans leur état chimique originel, comme cela doit arriver lors de la fixation par un agent neutre comme l'alcool ; ou bien sous forme de nouveaux composés formés par la combinaison de ces sels avec l'agent fixateur lui-même, comme ce serait le cas, par exemple, pour le sublimé.

Il y a donc dans ces solutions à côté de l'hématéine un autre facteur essentiel, l'*alumine*, à laquelle peuvent s'ajouter certains autres corps qui peuvent jouer un rôle secondaire dans la coloration, comme par exemple le chlorure de calcium dans la solution de Kleinenberg. En un mot, il y a, comme nous l'avons fait remarquer au numéro 100, un parallélisme étroit entre les teintures à l'hématéine et les teintures au carmin. Ces principes étant admis, il suit que la première préoccupation de l'histologiste qui travaille avec des teintures à base d'hématoxyline doit être de réaliser la conversion de l'hématoxyline de ses solutions en hématéine, afin d'obtenir la formation de la laque aluminique d'hématéine désirée. S'il se contente de laisser l'oxydation se faire par le procédé anciennement usité de « maturation » des solutions par l'action de l'air, il surgit des inconvénients. En premier lieu, la maturation spontanée est fort longue ; elle exige des semaines, souvent même des mois. Ensuite, le processus d'oxydation ainsi mis en jeu ne s'arrête pas au moment voulu, c'est-à-dire aussitôt que l'hématoxyline a été convertie en hématéine. Il continue, et l'hématéine formée subit à son tour une oxydation ultérieure qui la convertit en des composés incolores ; la solution devient *trop mûre*, et commence

Digitized by Google

à précipiter. Une telle solution est donc en réalité un mélange, dans des proportions toujours changeantes, d'éléments pas mûrs, d'éléments mûrs et d'éléments trop mûrs. Les premiers et les derniers de ces éléments sont sans effet pour la teinture ; et en conséquence la puissance colorante de la solution est très inconstante.

Cet inconvénient ne se laisse éliminer que très imparfaitement par les anciennes méthodes. Maintenant, grâce aux importantes recherches de MAYER et d'UNNA, un grand progrès a été réalisé.

Le point essentiel des résultats de MAYER, c'est qu'il faut prendre pour base des solutions colorantes, non l'hématoxyline mais l'hématéine. Nous sommes ainsi soulagés du coup de l'obligation de la maturation ennuyeuse et aléatoire des solutions par l'air, d'après la vieille méthode. Nous avons d'emblée une solution mûre. Et pour empêcher la surmaturation spontanée de cette solution, nous avons une méthode très simple d'UNNA, dont il sera question tout à l'heure.

125. De l'hématéine (MAYER, *loc. cit.*). — L'hématéine en substance est une masse d'un vert foncé, rouge à la lumière transmise, qui se résout si on la broye en une poudre brune. Elle se dissout entièrement, quoique non sans peine, dans l'eau distillée et dans l'alcool, en donnant une solution d'un brun jaunâtre qui ne se trouble pas par l'addition d'acide acétique. Avec les alcalis elle donne des solutions d'un violet bleu.

L'hématéine se trouve aujourd'hui dans le commerce ; mais MAYER n'a pu se la procurer pure que chez GEIGY and C°, à Bâle. Heureusement il se trouve aussi dans le commerce un composé ammoniacal d'hématéine, c'est l'*Haematein-Ammoniak*, ou *hématéate d'ammoniaque* connu aussi sous le nom de *haemateinum crystallisatum*. On trouve ce produit, d'une pureté suffisante, chez E. MERCK, à Darmstadt. Ce composé est plus facilement soluble dans l'eau et dans l'alcool que ne l'est l'hématéine, et sert tout aussi bien pour les teintures. On peut du reste très facilement se le préparer soi-même, ce qui se fait de la manière suivante.

126. Hématéate d'ammoniaque (MAYER, *ibid.*). — On fait dissoudre à l'aide de la chaleur 1 gramme d'hématoxyline dans 20 cc. d'eau distillée et l'on filtre s'il y a lieu. On ajoute 1 cc. d'ammoniaque caustique (d'une densité de 0gr,875) et l'on porte le liquide pourpre qu'on a ainsi obtenu dans une capsule de telles dimensions que le fond n'en soit pas couvert à plus d'un demi-centimètre de profondeur. On laisse évaporer à la température de l'air et à l'abri de la

Digitized by Google

poussière. On doit recueillir en hématéate d'ammoniaque une quantité approximativement égale à celle de l'hématoxyline employée. Il ne faut pas activer l'évaporation par la chaleur, car cela pourrait provoquer la formation de composés insolubles dans l'alcool. Le produit ne doit pas être touché par des instruments d'une substance autre que le verre, la porcelaine ou le platine, jusqu'à ce qu'il soit devenu parfaitement sec.

Nous donnons plus loin les formules de MAYER pour la préparation de teintures au moyen d'hématéine ou d'hématéate d'ammoniaque; mais avant de le faire, nous décrirons la méthode d'UNNA pour la conservation de solutions d'hématéine. (Sa méthode d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène n'est rien moins que pratique, et nous la supprimons.)

127. Solution mi-mûre et constante d'Unna (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 4, 1892, p. 483). — Unna a cherché le moyen d'arrêter au point voulu ce processus d'oxydation continue et spontanée qui, comme nous l'avons dit, conduit rapidement à un état de maturité excessive. Et il a trouvé le moyen de l'arrêter à une étape quelconque, de manière à produire une *solution mi-mûre constante*. On arrive à ce résultat par le simple moyen d'additionner la solution d'un *agent réducteur*. Unna recommande la formule suivante :

Hématoxyline	1
Alun	10
Alcool	100
Eau	200
Soufre sublimé	2

En ajoutant le soufre à la solution hématoxylique au moment où celle-ci est devenue assez fortement bleuie, par exemple, après avoir attendu deux ou trois jours, on *fixe* le degré d'oxydation que la solution a atteint à ce moment. On peut alors employer la solution telle quelle pour la teinture. Elle ne donnera pas en cet état une coloration aussi énergique et aussi précise qu'une solution rendue *totalement* mûre par le peroxyde d'hydrogène; mais on aura l'avantage d'avoir une coloration qui ne demandera pas de décoloration subséquente par des acides.

Je pense qu'il est bon de connaître ce procédé, qui peut avoir son utilité dans certains cas qui peuvent se présenter. Mais je pense qu'il ne saurait prétendre à être mis sur le même rang que les méthodes de MAYER.

128. Caractères des teintures à l'hématéine (soit **hématoxyline**). — Les solutions aluminiques d'hématéine (soit hématoxyline, nous avons suffisamment expliqué que les soi-disant teintures à l'hématoxyline sont en réalité des teintures à l'hématéine) colorent en divers tons de bleu ou de violet rougeâtre selon la réaction de la solution employée. Les solutions neutres ou alcalines colorent en bleu pur;

Digitized by Google

les solutions acides donnent un ton rougeâtre. Pour faire virer au bleu le ton rouge produit par les solutions acides, c'est une pratique assez générale de traiter les préparations par de l'ammoniaque très diluée. Cette pratique repose sur la croyance que le virage au bleu serait l'effet de la neutralisation par l'ammoniaque de l'acide qui aurait été la cause du ton rouge. Il est des motifs pour croire que cette croyance est erronée. SQUIRE (*Methods and Formulae*, etc., 1892, p. 22) a démontré que des tissus colorés par la solution acide d'Ehrlich peuvent être bleuis par l'eau distillée parfaitement pure et ne contenant pas même une trace d'ammoniaque. SQUIRE admet cependant que le virage est activé par la présence dans l'eau d'une trace d'un alcali; ce qui explique la pratique, également très répandue, qui consiste à bleuir les préparations en les lavant pendant un temps suffisant (qui peut être jusqu'à plusieurs heures) dans de l'eau de source, qui est généralement chargée d'une quantité suffisante de carbonate de chaux ou autres corps basiques. MAYER donne une autre explication de la réaction. L'ammoniaque n'agirait pas en neutralisant l'acide, mais en précipitant l'alumine combinée à l'hématéine. S'il n'y avait pas d'alumine en jeu, l'ammoniaque produirait un virage au violet, non au bleu.

En tout cas, ce qu'il importe de retenir, c'est qu'on peut le plus souvent arriver au but par la simple eau de source, et qu'on y arrive avec une entière certitude par une solution de bicarbonate de soude, ou d'acétate de soude ou de potasse. C'est ce dernier qui est le plus inoffensif (MAYER). (Le virage de coupes peut être obtenu en quelques minutes en les traitant par une solution à 1 p. 1000 de bicarbonate de soude dans l'eau distillée (SQUIRE, *l. c.*). (Voyez aussi *Hæmacalcium*, n° 139.) Et c'est bien là la marche à préférer, car l'ammoniaque n'est certes pas un réactif inoffensif pour les éléments histologiques délicats. Naturellement toute cette question de virage est à distinguer de celle de la nécessité qu'il peut y avoir de neutraliser par un alcali des tissus qui ont été traités par un acide pour corriger une sur-coloration. Dans ce cas la neutralisation peut être indiquée dans l'intérêt de la *permanence* de la coloration.

D'après WATNEY (*Phil. Trans.*, 1882, p. 1075; KRAUSE, *Intern. Zeit. f. Anat. u. Hist.*, I, p. 154), nous citons d'après MAX FLESCH, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 353), on obtient un bleu intense si l'on emploie des teintures faites avec de l'alun fraîchement préparé; tandis qu'on obtient un ton rouge si l'on emploie de l'alun vieux dans lequel il s'est développé de l'acide libre, comme cela arrive presque toujours pour l'alun longtemps conservé. On obtient cette réaction surtout avec les solutions dans lesquelles la proportion d'alun est moindre que le tiers de l'extrait de bois de Campêche

Digitized by Google

employé. Les solutions rouges colorent le tissu conjonctif et le protoplasma de ses cellules, de même que les granules des cellules à granulations (« Plasmazellen ») ; tandis que les solutions bleues présentent une affinité spéciale pour la mucine et pour presque toutes les sortes de noyaux.

Or, LANGHANS (d'après Max Flesch, *loc. cit.*) a découvert qu'on peut obtenir ces deux réactions électives avec une seule solution. Il suffit pour cela de colorer par l'hématoxyline de DELAFIELD et après avoir monté les préparations au baume, de les exposer pendant un temps prolongé à la lumière. (Les préparations à la glycérine ne fournissent pas cette réaction.)

Aucune des *anciennes* solutions préparées avec l'*hématoxyline* n'est parfaitement stable (ni du reste le Hémalun non plus) comme nous l'avons suffisamment expliqué plus haut; tout au plus en trouverait-on une ou deux qui soient un peu tolérables à cet égard (celle d'Ehrlich cependant se maintient très bien) (MAYER).

Les teintures hématoxyliques à laque alunique passent pour être des colorants nucléaires. Elles le sont en ce sens qu'elles ont une affinité énergique pour la chromatine des noyaux. Mais elles ont aussi des affinités très marquées pour bien des éléments de la cellule en dehors du noyau. Elles ne fourniront donc des élections pures de la chromatine que moyennant les précautions voulues, teinture pas trop prolongée, ou bien lente, mais faite dans des solutions très diluées. Avec la plupart de ces solutions les colorations excessives s'établissent avec la plus grande facilité. On les corrige par des lavages prolongés dans de la solution d'alun (d'une concentration de 0,5 à 1 p. 100 par exemple), mais cela demande le plus souvent beaucoup de patience. On arrive plus vite au but en employant un acide quelconque, par exemple, l'acide chlorhydrique (de 0,1 à 0,2 ou même 0,5 p. 100). Après ces lavages, pour assurer la permanence de la teinture, il faut neutraliser les tissus avec un alcali (voyez plus haut ce qui a été dit à propos du bleuissage de la coloration).

Le bicarbonate de soude à 0,1 p. 100 sert bien pour ces neutralisations. Si l'on désire employer ce sel en solution alcoolique, on peut procéder comme l'indique VON WISTINGHAUSEN (*Mitth. Stat. Zool. Neapel*, X, 1891, p. 41 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 480). On fait dissoudre du bicarbonate de soude à l'aide de la chaleur dans de l'alcool à 70 p. 100 (il s'en dissout très peu), et l'on filtre après refroidissement. Pour les lavages, on ajoute 3 à 5 gouttes de la solution à un verre de montre d'alcool à 70 p. 100.

Il faut user de précautions sérieuses pour assurer la permanence de la coloration. Si l'on a employé des acides, il faut les enlever complètement ou les neutraliser avec le plus grand soin. La plupart des teintures donnent des colorations qui se conservent mieux dans le

Digitized by Google

baume que dans les milieux aqueux. Mayer trouve que ses préparations à l'hématéine se sont bien conservées tant dans des milieux aqueux que dans le baume (voyez plus loin).

Les *nouvelles teintures à base d'hématéine* sont en grande partie exemptes des inconvénients que nous venons d'énumérer.

129. Emploi. — Ces teintures servent à des besognes très variées. Il en est une pour laquelle elles sont à peu près indispensables, c'est la coloration en masse d'objets qui ont été fortement fixés dans des liquides chromiques ou osmiques. Pour ces cas, l'hématéine peut réussir là où tout autre colorant échouerait. Elle rend aussi de grands services pour certaines recherches spéciales, telles que l'étude du Nebenkern et de la figure achromatique de la division mitosique, agissant en ces cas comme colorant plasmatique. Elle fournit aussi des colorations spécifiques et très importantes d'éléments nerveux (voir à la Deuxième Partie). Bien des histologistes s'en servent à titre de colorant normal pour leurs coupes. On peut admettre que depuis que les travaux de Mayer et d'autres nous ont mis à même de régler d'une manière scientifique l'emploi de l'hématéine, cette pratique est justifiable.

Pour les coupes je recommande beaucoup, outre l'Hémalun de Mayer le procédé à la laque d'alun de fer de M. Heidenhain, qui m'a donné des résultats superbes et est en somme assez facile à exécuter.

Pour les colorations en masse, l'Hémalun ou l'Hémacalcium de Mayer.

Quant aux anciennes méthodes, je n'hésite pas à dire que, eu égard aux grands avantages offerts par les procédés de Mayer, les anciennes méthodes doivent être abandonnées, et seules les formules de Mayer, ou du moins des formules qui se conforment aux principes établis par ce savant, doivent être employées par les travailleurs sérieux. (Ceci s'entend seulement des procédés usuels de coloration par les laques aluminiques, et non des procédés spéciaux par les laques chromiques, etc.)

A. — Laques aluminiques

a. *Solutions aqueuses.*

130. Hémalun (Mayer, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, I, 1891, p. 172). — On fait dissoudre 1 gramme d'hématéine ou d'hématéate d'ammoniaque (n° 125) à l'aide de la chaleur dans 50 cc. d'alcool à 90 p. 100 et on l'ajoute à une solution de 50 grammes d'alun dans un litre

Digitized by Google

d'eau distillée. On laisse refroidir et déposer, on filtre s'il y a lieu, et l'on ajoute un cristal de thymol. On obtient un liquide foncé d'un ton violet rougeâtre. Le ton exact dépendra beaucoup de la qualité de l'alun (MAYER). Cette teinture correspond à l'hématoxyline de BÖHMER[1]. Elle colore largement aussi bien, et cela soit immédiatement, soit plus tard, car elle est naturellement mûre dès le premier moment. On peut s'en servir, soit concentrée, soit diluée. A l'état concentré, elle colore presque instantanément (des coupes ont été colorées en les inondant une seule fois du liquide). Allongée de vingt volumes d'eau distillée, elle colorera des tentacules de *Tubularia* à travers toute leur épaisseur en une heure (pour allonger les solutions, il faut avoir soin de n'employer que l'eau distillée ou plutôt une solution faible d'alun dans l'eau distillée). Les lavages peuvent se faire soit à l'eau distillée, soit à l'eau de source.

Cette teinture est *admirable pour les colorations d'objets entiers*. Des objets volumineux demanderont cependant un bain de vingt-quatre heures et un lavage de même durée (au mieux dans de la solution d'alun au centième, si l'on désire une coloration nucléaire très précise).

Les préparations se conservent bien dans la glycérine, pourvu que celle-ci ne soit pas acide, et aussi dans le baume. Il faut observer que si l'on a employé l'essence de bergamote pour l'éclaircissement, il faut l'enlever soigneusement par de l'essence de térébenthine avant de passer au baume ; et que l'emploi de l'essence de girofles n'est pas sans danger. Il vaut mieux (MAYER, *in litt.*) n'employer que le xylol, le benzol et le chloroforme, et monter dans le baume au xylol ou au chloroforme. La solution d'hémalun peut être additionnée de carmin à l'alun, de fuchsine-acide, etc., afin de produire des colorations doubles ; mais pour ce but il semble préférable d'employer les deux teintures successivement.

131. Hémalun acide (MAYER, *loc. cit.*, p. 174, note). — C'est de l'hémalun additionné de 2 p. 100 d'acide acétique cristallisable (ou de 4 p. 100 d'acide acétique ordinaire). Emploi comme pour l'hémalun simple, lavage à l'eau de source pour bleuir la coloration. Cette solution donne une coloration nucléaire peut-être encore plus précise que l'hémalun simple. Elle a aussi l'avantage de ne pas donner

[1] Comme pour la formule de Böhmer, il n'est pas nécessaire de se conformer exactement aux proportions indiquées. On peut toujours improviser une solution d'hémalun en ajoutant quelques gouttes de solution alcoolique d'hématéine à une solution d'alun de la concentration qu'on voudra.

Digitized by Google

de précipités par suite d'une décomposition partielle provoquée par l'ammoniaque de l'air et l'alcali du verre des flacons, phénomène qui se manifeste bien à un certain degré pour l'hémalun simple, cependant pas au point de nuire à sa puissance tinctoriale.

131 *bis*. **Solution mûre de Hansen** (*Zool. Anz.*, 1895, p. 158). — Après avoir essayé plusieurs moyens d'oxydation, Hansen s'est arrêté au *permanganate de potasse*. On fait dissoudre 1 gr. d'hématoxyline cristallisée dans 10 gr. d'alcool absolu.

On fait dissoudre à l'aide de la chaleur 20 gr. d'alun de potasse dans 200 gr. d'eau distillée et l'on filtre après refroidissement. Le lendemain on mêle les deux solutions.

On met dans une capsule de porcelaine 3 cc. de solution aqueuse concentrée de permanganate de potasse (à 15° C. il se dissout une partie de permanganate pour 16 d'eau). On ajoute la solution d'hématoxyline, et tout en remuant continuellement on chauffe graduellement jusqu'à ébullition. Le liquide devient violet-rouge foncé. On laisse bouillir pendant une demi-minute à une minute. Alors on refroidit le mélange, au mieux rapidement, en faisant flotter la capsule sur de l'eau froide. On filtre après refroidissement, mais en général la filtration n'est guère nécessaire. La solution est maintenant mûre et prête à servir.

Le motif pour lequel Hansen a été conduit à élaborer ce procédé de préparation, c'est qu'il avait fait l'expérience que l'hématéine du commerce n'est pas d'une qualité constante et ne fournit pas toujours des solutions identiques sous le rapport de la coloration des tissus. Hansen trouve que son procédé fournit un produit plus égal. Et il paraît trouver son procédé plus simple et plus rapide que celui de Mayer pour la préparation d'hématéate d'ammoniaque.

Une solution fraîchement préparée m'a donné des résultats de toute beauté. La marche de la coloration est semblable à celle de l'hémalun, et les résultats sont à tel point identiques qu'il serait fort difficile sinon impossible de reconnaître les coupes colorées par les deux méthodes, si elles venaient à perdre leurs étiquettes.

Hansen dit que sa solution se conserve mieux que les autres. Celle que j'ai préparée a formé en peu de jours une pellicule qui a rendu nécessaire une filtration ; et peu de jours après le phénomène s'est renouvelé. Et Mayer (*in litt.*) a trouvé après peu de jours un fort précipité. La précipitation dans mon flacon continue ; et je pense qu'en vue de ce grave inconvénient la solution de Hansen ne peut pas prétendre à remplacer celle de Mayer.

132. Solution ammoniacale (*Ammoniated Hematoxyline* de Squire, Squire, *Methods and Formulæ*, etc., 1892, p. 24).

Je l'ai essayée. Elle me fait l'effet de ne pas être d'une maturité constante, et je ne puis pas la recommander au même titre que l'hémalun de Mayer, dont la coloration me paraît d'ailleurs sensiblement plus délicate.

133. Hématoxyline de Bœhmer (*Arch. f. mik. Anat.*, IV, 1868, p. 345 ; — parait avoir été publiée en premier lieu, avec des proportions un peu

Digitized by Google

différentes, dans le *Aerztliches Intelligenzbl.*, Baiern, 1865, n° 38). — On fait une solution de :

Hématoxyline cristallisée	1 partie.
Alcool absolu.	12 —

Et une seconde solution de :

Alun purifié	1 partie.
Eau distillée	240 —

On ajoute deux ou trois gouttes de la première à un verre de montre plein de la seconde.

Pour avoir de *bonnes* colorations il faut laisser mûrir longtemps (selon MAYER, deux mois).

On peut conserver en réserve une provision de la solution alcoolique d'hématoxyline. Elle devient brune, mais ne perd pas ses qualités pendant des années.

Nous pensons que quiconque a réfléchi aux principes exposés dans les premiers paragraphes de ce chapitre ne se servira plus de cette formule ancienne que comme dernière ressource dans des moments où il n'aurait pas sous la main une teinture se conformant mieux à ces principes

134. Hématoxyline à l'alun ; RANVIER (*Comptes rendus Acad. Sc.*, 1882, 2e Sem., t. XCV, p. 1375, — et CONTEJEAN (*Bull. Soc. Philomath.* Paris, 8, 3, 1891, p. 117).

135. Hématoxyline de DELAFIELD. — Cette formule a une histoire curieuse. Employée depuis longtemps dans l'Institut pathologique de Heidelberg, elle fut communiquée par Pfitzner à Flemming, qui, en la recommandant d'une façon particulière dans son *Zellsubstanz Kern u. Zelltheilung*, la fit connaître et apprécier. Flemming l'attribua d'abord à Grenacher. Plus tard, ayant appris que cette attribution était erronée, il crut devoir l'attribuer à Prudden ; et ce n'est que récemment (*Zeit. f. wiss. Mikroskopie*, II, 1885, p. 288) que nous avons appris par Prudden que la formule est due à Delafield. Nous la donnons d'après Prudden, *loc. cit.* A 400 cc. d'une solution saturée d'alun d'ammoniaque dans l'eau (il se dissout environ 1 partie dans 11 d'eau), on ajoute 4 grammes d'hématoxyline cristallisée dissoute dans 25 cc. d'alcool fort. On laisse le tout exposé à l'air et à la lumière pendant trois ou quatre jours, on filtre et on ajoute 100 cc. de glycérine et 100 cc. d'alcool méthylique (esprit-de-bois, CH^4O). On laisse reposer jusqu'à ce que la solution ait acquis une couleur suffisamment foncée (on fera bien de laisser mûrir très longtemps, six semaines à deux mois), on filtre, et l'on conserve la solution dans un flacon bien bouché. Au moment de s'en servir, on doit l'étendre d'une quantité considérable d'eau.

On peut, et avec avantage, se servir d'hématéine pour fabriquer cette teinture (MANN, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1895, p. 487).

Cette solution est une teinture très énergique. Elle colore en général des éléments extra-nucléaires en même temps que la chromatine des noyaux. En effet, c'est à titre de colorant plasmatique qu'elle fut préconisée par Flemming (*l. c.*). Je l'ai employée comme colorant plasmatique pour des coupes, avec de bons résultats. Mais je pense que pour cette fin elle a fait

Digitized by Google

son temps. Bien d'autres teintures seraient à lui être préférées à cet égard (hématoxyline à l'alun de fer de M. Heidenhain, Kernschwarz, safranine et Lichtgrün de Benda, et d'autres encore). Elle pourra peut-être encore être utile pour la coloration en masse de tissus très réfractaires à la coloration.

Bütschli (*Unters. ueb. mikroskopische Schäume*, etc., 1892 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 197) a recommandé d'allonger la solution fortement d'eau et d'y ajouter assez d'acide acétique pour donner un ton franchement rouge.

136. Hématoxyline acide d'Ehrlich (*Zeit. f. wiss Mik.*, 1886, p. 150) :

Eau	100 cc.
Alcool absolu	100 —
Glycérine	100 —
Acide acétique cristallisable	10 —
Hématoxyline	2 gr.
Alun	en excès.

On laisse ce mélange exposé pendant longtemps à la lumière, jusqu'à ce qu'il ait pris une teinte rouge saturée. A partir de ce moment, la solution est devenue stable ; sa puissance de coloration ne varie pas, même pendant des années ; et il ne s'y forme pas de précipités, du moins si l'on a soin de conserver la solution dans un flacon bien bouché. Pour obtenir des colorations doubles, on peut y ajouter des matières colorantes sous forme d'acides libres (par exemple de l'éosine) ou de bases colorantes.

Des coupes de matériaux durcis soit par l'alcool, soit par le bichromate se colorent en quelques minutes, et donnent une coloration nucléaire *sans aucune surcoloration, laquelle n'a même pas lieu après une immersion prolongée*. Pour cette raison, cette teinture est très propre à la coloration de pièces en masse.

Pour avoir la coloration bleue, il faut laver à l'eau de source.

Il me semble que de toutes les anciennes formules que j'ai essayées, c'est celle-ci qui m'a donné les colorations nucléaires les plus précises et les plus faciles à réaliser.

On peut avec avantage se servir d'hématéine pour faire la teinture (Mann, *Zeit. f. wiss. Mik*, XI, 4, 1895, p. 487.)

137. Glycérine hématoxyline de Renaut (*Arch. de Physiol.*, 1881, p. 640).

138. Autres solutions aluniques aqueuses. Arnold, *Quart. Journ. Mic. Sci.*, 1878, p. 86. Mitchell, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1884, p. 311 (méthode très compliquée d'extraire le bois de Campêche). Hickson, *Quart.*

Digitized by Google

Journ. Mic. Sci., 1885, p. 244 (idem). COOK, *Journ. of Anat. and Phys.*, 1879, p. 140 (solution au sulfate de cuivre; j'en ai trouvé la préparation par trop aléatoire). HAUG, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, I, 1891, p. 51 (solution à l'acétate d'alumine). SANFELICE, *Journ. de Microgr.*, XIII, 1889, p. 335; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1889, p. 837) (MAYER, qui a étudié cette teinture (v. *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, I, 1891, p. 178-182) dit que c'est essentiellement une solution de Boehmer contenant une plus grande proportion d'alcool et un peu d'iode. L'iode n'aurait pas d'autre utilité que d'empêcher la précipitation de la matière colorante à la surface des organes). GAGE, *Proc. Amer. Mic. Soc.*, 1893, p. 125; cf. *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1893, p. 564 (solution additionnée d'hydrate de chloral pour prévenir le développement de ferments vivants. Elle ne se conserve pas mieux pour cela (MAYER, *in litt.*). HACHE, *Comptes rend. Soc. Biol.* Paris, 10, I, 1894, p. 253-369 (compliqué et superflu, MAYER, *in litt.*).

b. *Solutions alcooliques.*

139. Hæmacalcium (MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, I, 1891, p, 182). — Hématéine (ou bien hématéate d'ammoniaque, n° 125), 1 gr.; chlorure d'aluminium, 1 gr.; chlorure de calcium, 50 gr.; acide acétique cristallisable, 10 cc. (ou 20 cc. de l'acide ordinaire); alcool à 70 p. 100, 600 cc. Broyez intimement ensemble les deux premiers ingrédients; ajoutez l'acide et l'alcool et faites dissoudre à l'aide de la chaleur ou à froid; ajoutez en dernier lieu le chlorure de calcium.

Liquide d'un violet rougeâtre, imaginé pour remplacer l'hématoxyline de Kleinenberg en vue des sérieux désavantages qui sont inséparables de la préparation de cette dernière (voyez plus bas, n° 141). Emploi comme pour celle-ci. Si les tissus se colorent en un ton trop rouge, il faut les traiter par une solution de chlorure d'aluminium dans l'alcool (2 p. 100 environ), ou par une solution (de 0,5 à 1 p. 100) d'acétate de soude ou de potasse dans l'alcool absolu, ou par du bicarbonate de soude (voyez au n° 128, vers la fin).

Avec certains objets, la pénétration de cette teinture laisse à désirer, la coloration ne se faisant bien que dans les couches superficielles. On remédie à cela soit en acidifiant la solution, soit (ce qui vaut mieux) en laissant les objets pendant quelque temps avant la coloration dans de l'alcool acidifié. En tout cas, les tissus à colorer *ne doivent pas avoir une réaction alcaline*. En prenant ces précautions, il ne sera pas nécessaire d'employer des acides pour les lavages.

Enfin, pour certains objets (Hydraires, par exemple), on peut augmenter la puissance de pénétration du liquide en l'allongeant d'environ un tiers de glycérine ou en augmentant la proportion de chlorure d'aluminium, jusqu'à environ huit fois celle de l'hématéine.

Digitized by Google

MAYER a trouvé depuis (*Mitth.*, X, 3, 1892, p. 499) que a solution n'est pas parfaitement stable, mais vire au bleu avec le temps et précipité. Pour éviter cet inconvénient on peut faire le mélange dans deux flacons, dont chacun contiendra la moitié de l'alcool et de l'acide, mais l'un d'eux contiendra en outre tout le chlorure de calcium, et l'autre toute l'hématéine et tout le chlorure d'aluminium. On prend alors pour préparer le bain de teinture une quantité égale dans chaque flacon.

Il faut bien comprendre que MAYER ne recommande pas cette solution comme donnant d'aussi bons résultats, *comme teinture*, que l'Hémalun ; elle lui est au contraire inférieure sous le rapport de la coloration. MAYER est même d'avis qu'aucune solution *alcoolique* d'hématéine ne saurait fournir une coloration aussi précise que les solutions aqueuses ; car la nature aqueuse de la menstrue paraît être en elle-même une condition favorable pour la qualité de la coloration. Il la recommande seulement à titre de remplaçant de l'hématoxyline de Kleinenberg pour les cas qui demandent une teinture alcoolique, comme étant facile à préparer, commode à employer, et d'un effet constant. Or aucune de ces qualités ne peut être attribuée à l'hématoxyline de Kleinenberg.

140. Hémalun alcoolique (MAYER, *l. c.*, p. 183, note).

C'est suivant le conseil de MAYER lui-même que je supprime cette formule.

141. Hématoxyline alcoolique de KLEINENBERG (*Éléments d'embryologie* de FOSTER et BALFOUR, 1877, p. 296 ; *Quart. Journ. Mic. Science*, 1879, p. 208). — On fait une solution saturée de chlorure de calcium dans de l'alcool à 70° et l'on ajoute un peu d'alun (on peut saturer d'alun si l'on veut). On filtre cette solution et on l'étend de 6 à 8 volumes d'alcool à 70°. *Au moment d'employer* ce liquide, on l'additionne de quelques gouttes d'une solution concentrée d'hématoxyline dans l'alcool absolu, de manière à former une teinture plus ou moins foncée, selon la nature des objets à colorer. (Nous citons les instructions données par Kleinenberg. Nous avons trouvé, pour notre part, qu'il est préférable de ne pas colorer avec une solution préparée *sur l'heure*, mais de laisser mûrir la teinture pendant au moins vingt-quatre ou quarante-huit heures.)

La teinture d'hématoxyline récemment préparée doit être d'un violet virant au bleu, et ne doit pas présenter une nuance rouge. On comprend facilement la faveur dont ce liquide a joui auprès des naturalistes pendant si longtemps. C'est que c'était la seule teinture *vraiment alcoolique* d'hématoxyline qui eût été proposée. Elle répondait à un besoin véritable, et lorsque tout avait réussi dans la préparation et dans l'emploi elle donnait des résultats excellents. Mais cette préparation était toujours chose des plus incertaines. La formule de Kleinenberg est à tel point irrationnelle qu'il est impossible de l'exécuter à la lettre ; en conséquence, les propriétés du produit qu'elle fournissait étaient tout ce qu'il y a de moins constant. Et

Digitized by Google

naturellement les résultats de la teinture étaient inconstants aussi. Pour ces motifs je pense que ce liquide, qui m'a rendu pourtant dans le temps de bons services, doit être abandonné en faveur de l'Hémacalcium de MAYER. J'ai donc supprimé les très longues et minutieuses instructions obligées concernant son emploi. J'ai aussi supprimé, à regret, par manque de place uniquement, la très instructive et très détaillée critique de PAUL MAYER (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, I, 1891, p. 174), (à qui je suis en une large mesure redevable du point de vue auquel je me place maintenant), comme aussi la critique excellente et parfaitement autorisée de SQUIRE (*Methods and Formulæ*, etc., 1892, p. 25).

Deux formules alternatives ont été proposées par DIPPEL (dans son *Handb. der Mikroskopie*) dans le but d'éviter la double décomposition de l'alun et du chlorure de calcium en prenant du chlorure d'aluminium en premier lieu. Voyez les critiques de cette proposition dans les travaux précités de MAYER et de SQUIRE.

Les formules modifiées de SQUIRE (*l. c.*) et de VON WISTINGHAUSEN (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, 1891, p. 41 ; cf. *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 479) ne paraissent pas écarter la difficulté qu'il y a à arriver à la production de la proportion voulue de chlorure d'aluminium par la double décomposition d'alun et de chlorure de calcium.

142. Hématoxyline à l'iodiure de potassium (CUCCATI, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, I, 1888, p. 55).

B. — AUTRES LAQUES

143. Hématoxyline au bichromate de potasse (HEIDENHAIN, *Arch. f. mik. Anat.*, 24 Bd., 1884, p. 468). — On colore pendant huit à dix heures dans une solution d'hématoxyline dans l'eau d'une concentration de 0,5 à 1 p. 100. Puis on met les objets pendant le même temps dans une solution de bichromate de potasse de la même concentration. On enlève l'excès de bichromate par le lavage à l'eau, on traite par l'alcool suivant les méthodes connues, et l'on pratique l'inclusion, s'il y a lieu, dans la paraffine ou dans le baume.

Les noyaux se trouvent colorés en noir, les autres éléments en diverses nuances de gris. L'avantage de la méthode consiste précisément dans la clarté avec laquelle elle fait ressortir ces autres éléments qui, par les méthodes ordinaires de teinture élective, ne se voient pas facilement. Elle réussit avec tous les tissus, excepté le foie et le rein.

On ne doit employer que de petits objets. Les pièces doivent avoir été préalablement bien durcies à l'alcool.

(Les pièces qui ont été fixées par le sublimé doivent en avoir été débarrassées par un lavage prolongé à l'eau, car les traces de sublimé qui restent dans les tissus forment avec l'hématoxyline neutre un

Digitized by Google

précipité noir foncé ; pour éviter la formation de ce précipité, il est bon de colorer à l'obscurité. (TORNIER, *Arch, f. mik. Anat.*, XXVIII, 1886, p. 181 ; *Zeit. f. wiss. Mik.* III, 3, 1886, p. 467.)

On peut employer des objets chromiques, à condition qu'ils aient été bien lavés. On peut atténuer les colorations excessives en lavant plus longtemps dans le bichromate. Gierke a trouvé que des pièces qui étaient presque noires dans l'hématoxyline se décoloraient entièrement par un lavage de quarante-huit heures dans la solution de bichromate.

HEIDENHAIN recommande maintenant (*Arch. f. mik. Anat.*, 1886, p. 383) la modification suivante : — Les pièces durcies à l'alcool ou à l'acide picrique sont colorées pendant douze à vingt-quatre heures dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 1/3 p. 100 et décolorées ensuite dans une solution à 0,5 p. 100 de chromate simple de potasse, au lieu de bichromate. L'avantage de cette modification du procédé est que, appliquée à des pièces peu volumineuses, elle donne une coloration extrêmement précise de la chromatine.

L'un et l'autre de ces procédés donnent de très belles colorations. Ils offrent le grand avantage de permettre à l'opérateur d'arriver toujours au degré de différenciation voulue par le lavage dans la solution décolorante. S'il s'agit de coupes, le contrôle peut se faire au microscope.

144. Procédé au bichromate d'Apathy (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, I, 1888, p. 47). Cette modification de la teinture de Heidenhain est un procédé *alcoolique*. On colore dans une solution à 1 p. 100 d'hématoxyline dans de l'alcool à 70 ou 80 p. 100. On différencie dans une solution à 1 p. 100 de bichromate de potasse dans de l'alcool à 70 ou 80 p. 100, Des coupes minces, c'est-à-dire de 10 à 15 μ, demanderont une différenciation durant la moitié du temps employé à la coloration ; et des coupes épaisses, c'est-à-dire de 25 à 40 μ, demanderont une différenciation de deux fois la durée de la coloration.

Le bichromate de potasse est très peu soluble dans l'alcool fort. On peut commodément préparer la solution en mélangeant 1 partie d'une solution aqueuse à 5 p. 100 avec environ 4 parties d'alcool de 80 à 90 p. 100. Le mélange doit être fraîchement préparé au moment de servir, et il doit être tenu à l'obscurité complète pendant toute la durée de la différenciation, vu que la lumière le ferait précipiter. Il doit être renouvelé plusieurs fois pendant la durée de la différenciation. Lorsque les objets auront été suffisamment décolorés, ils doivent être soigneusement lavés (toujours dans l'obscurité) dans de l'alcool

Digitized by Google

à 70 p. 100 plusieurs fois renouvelé. Ce procédé donnerait, d'après Apathy, des préparations plus transparentes et d'une coloration plus précisément localisée que le procédé de Heidenhain. Il est évident que la nature alcoolique des liquides employés peut souvent avoir son importance.

Pour la coloration de séries de coupes faites à la cellöidine Apathy (*ibid.*, VI, 2, 1889, p. 170) modifie le procédé comme suit. Les coupes sont colorées dans la teinture d'hématoxyline pendant 10 minutes. L'excès de teinture est alors enlevé de chaque coupe au moyen de papier buvard, et les coupes sont portées dans de l'alcool à 70 p. 100 additionné seulement de quelques gouttes de la solution aqueuse de bichromate. Elles y restent 5 à 10 minutes (toujours dans l'obscurité). On obtient une coloration semblable à celle qui est donnée par le traitement en masse du premier procédé.

145. Hématoxyline à l'alun de fer de M. Heidenhain[1]. (M. Heidenhain, *Ueber Kern. u. Protoplasma*, dans *Festschr. f. Kölliker*, 1892, p. 118). — *Pour les coupes seulement.* Des coupes sont traitées pendant une demi-heure, ou au plus deux ou trois heures, par une solution aqueuse d'alun ferrique (sulfate double d'ammoniaque et de sesquioxyde de fer[2] $(NH_4)_2 Fe_2 (SO_4)_4$. On les lave un moment à l'eau et on colore (de une demi-heure jusqu'à douze heures) dans une solution aqueuse d'hématoxyline (0,5 p. 100 environ). On rince à l'eau, et l'on traite de nouveau par la même solution d'alun de fer qui a servi au mordançage. La décoloration se fait assez lentement. (Elle sera cependant souvent assez complète au bout d'une vingtaine de minutes, à ce que j'ai trouvé.) On peut et on doit en contrôler le progrès sous le microscope (on peut dans ce but remettre les coupes dans de l'eau autant de fois qu'on voudra). La différenciation obtenue, on lave bien à l'eau (je conseille de laver *beaucoup*, *au moins* un quart d'heure dans de l'eau courante, cependant pas plus de trente minutes à une heure (Heidenhain). On déshydrate, et l'on monte au baume.

Voici quelques détails supplémentaires qui ont été donnés par Heidenhain dans *Arch. f. mik. Anat.* XLIII, 3, 1894, p. 431, 435. Pour faire la teinture, il vaut mieux employer l'hématoxyline que

[1] Ceci est une modification d'une ancienne méthode, maintenant abandonnée, de Benda (*Verh. phys. Ges. Berlin*, 1885-6, n°s 12, 13, 14 ; *Arch. f. Anat. u. Phys.* 1886, p. 562). Benda mordançait dans l'alun ferrique, mais différenciait dans de l'acide chromique.

[2] « Schwefelsaures Eisenammonoxyd », sel double du sesquioxyde, en beaux cristaux violets ; ne pas confondre avec le sel double du protoxyde (cristaux verts, sel de Mohr), qui ne peut pas servir.

Digitized by Google

l'hématéine. L'alun de fer à employer doit se présenter sous forme de cristaux transparents d'un violet clair ; si ces cristaux deviennent jaunâtres et opaques, c'est qu'ils sont vieillis et ne peuvent plus servir. Il faut les conserver dans un flacon bien bouché à l'émeri. La solution doit être faite sans chaleur.

Les résultats diffèrent selon la durée du mordançage et de la coloration. Si l'on n'a donné que des bains de peu de durée dans le mordant et dans la teinture, par exemple une demi-heure dans chaque, on obtiendra une coloration *bleue* [1]. Ces préparations montreront une coloration très intense et élective de tous les éléments des noyaux, tant achromatiques que chromatiques, les éléments du cytoplasme demeurant peu colorés. Si au contraire on a donné des bains prolongés (12 à 18 heures) dans le mordant et dans la teinture (ce qui rendra nécessaire une différenciation un peu prolongée dans le deuxième bain de fer), on obtiendra une coloration *noire*. Ces préparations montrent les éléments des noyaux colorés comme dans la première méthode, mais en outre les « centrosomes » ou corpuscules polaires colorés en noir intense, la masse générale du cytoplasme tantôt incolore, tantôt grise, et en ce cas les fuseaux achromatiques et les plaques cellulaires sont colorés ; en outre, les fibres du tissu conjonctif sont noires, les corpuscules rouges du sang sont noirs, et les micro-organismes, s'il en existe dans les tissus, sont nettement démontrés. Le tissu musculaire strié devient également très beau (Mayer). Les préparations sont dites parfaitement permanentes.

Je ne puis que recommander beaucoup cette méthode, qui m'a donné pour certains objets de meilleurs résultats qu'aucune autre méthode à l'hématoxyline. On peut l'employer après fixation par le sublimé ou par les mélanges chromo-osmiques ou par l'alcool. Elle est facile à exécuter et donne des colorations de toute beauté [2]. Je lui reprocherais cependant de ne pas donner toujours des préparations parfaitement propres. On y rencontre souvent des précipités amorphes.

146. Hématoxyline à l'acétate de fer de Bütschli (Bütschli, *Unters. ueber mikroskopische Schäume u. das Protoplasma*, 1892 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 197). — Les tissus sont traités d'abord par une faible solution d'acétate de fer, d'un brun clair, puis lavés, et colorés dans une solution d'hématoxyline à 0,5 p. 100 dans l'eau. Ce procédé donne une coloration d'un noir bleu ou brun d'une intensité extraordinaire, qui inté-

[1] Mayer (*in litt.*) doute que le ton de la coloration puisse dépendre de la durée des bains.

[2] Pas toujours (Mayer).

Digitized by Google

resse le protoplasma en même temps que les noyaux. Il n'a de raison d'être que là où l'on demande surtout une intensité spéciale de coloration.

146 *bis*. Nouvelle méthode au sulfate de fer de Benda (*Verh. d. anat. Ges.*, VII, Vers. Göttingen, 1893, p. 161 ; *Zeit. f. wiss. Mik.* XI, I, 1894, p. 69, et Rawitz, *Leitfaden*, 1895, p. 73). — Le mordançage à l'alun ferrique (n° 145) a le grand inconvénient de donner lieu à la formation de précipités amorphes dans les préparations. Pour les éviter Benda procède maintenant comme suit. On emploie un matériel fixé de n'importe quelle façon. Les coupes sont mordancées pendant vingt-quatre heures dans le *Liquor ferri sulfurici oxydati* de la Pharmacopœa Germanica [1], allongé d'un ou de deux volumes d'eau. On lave bien à l'eau distillée, puis à l'eau de source, et l'on porte les coupes dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 1 p. 100 ou on les laisse jusqu'à ce qu'elles soient devenues noires. On lave et différencie dans de l'acide acétique à 30 p. 100 en surveillant la marche de la décoloration ; ou bien dans un acide plus faible, auquel cas il n'y aura pas besoin de surveiller la décoloration ; ou bien aussi dans la solution de sulfate de fer fortement allongée d'eau. Ce procédé s'applique à toute sorte d'organes et donne en particulier une excellente coloration pour les cylindres-axes, et les éléments achromatiques de cellules en spermatogénèse. On peut pour ce dernier objet ajouter une deuxième coloration par la fuchsine acide (auquel cas il est bon d'avoir différencié dans la solution de fer, qui agit comme mordant pour la fuchsine). On doit obtenir la chromatine, les centrosomes et les vestiges fusoriaux (Zwischenkörper) colorés en noir ; les filaments de linine et les filaments des fuseaux en rouge.

146 *ter*. Hématoxyline à l'acétate de cuivre de Benda. — (Du Bois Reymond's, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, *Phys. Abth.*, 1886, p. 186 et *Arch. f. mik. Anat.*, XXX, p. 49). — Des coupes de matériel fixé dans le liquide de Flemming sont collées sur des verres à couvrir et mises pendant vingt-quatre heures dans une forte solution d'acétate de cuivre, le tout étant tenu dans un incubateur à une température de 40° C. environ ou laissé pendant 48 heures à la température de la chambre. On lave et on colore pendant cinq minutes, ou jusqu'à une teinte grise foncée ou noire dans une solution à 1 p. 100 d'hématoxyline dans l'eau. On décolore par le lavage dans de l'acide chlorhydrique (à 1/300 ou 1/500 d'eau), lavage que l'on prolonge plus ou moins selon qu'on désire obtenir une coloration purement nucléaire ou une

[1] Sulfate de fer, 80 ; eau, 40 ; acide sulfurique, 15 ; acide nitrique, 18.

Digitized by Google

coloration plus ou moins plasmatique. Par cette décoloration, les préparations passent à une teinte jaune ; pour restituer la coloration bleu-gris de l'hématoxyline et la fixer, on remet les préparations dans la solution d'acétate de cuivre. Puis on lave, on déshydrate et monte au baume. Ce procédé a l'avantage de différencier les mitoses d'une manière très énergique, et donne en même temps une coloration plasmatique plus ou moins prononcée. Voyez aussi les observations de PIERSOL dans *Amer. Mic. Mon. Journ.*, 1887, p. 155 ; ou dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 158 ; ou dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 499.

147. Méthodes de Minot (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 177). — Ce sont des modifications des procédés de Weigert, de Heidenhain et de Bœhmer.

148. Hématoxyline de Weigert. — Cette méthode s'applique surtout à l'étude de la distribution des nerfs à myéline. Nous la décrirons, avec ses congénères, dans la deuxième partie.

C. — AUTRES COLORANTS VÉGÉTAUX

149. La purpurine. — (Voy. RANVIER, *Traité technique*, p. 280.)

150. Purpurine glycérique (GRENACHER, *Arch., f. mik. Anat.*, XVI, 1879, p. 470).

151. L'indigo n'est employé en histologie que sous forme de **Carmin d'indigo**. Cette substance, qui est le sel potassique ou sodique de l'acide sulfindigotique ou sulfocœruléinique, se trouve dans le commerce. Elle donne des colorations diffuses, plutôt plasmatiques, qui, combinées avec une teinture au carmin ou un autre réactif agissant seulement sur les noyaux, fournissent des colorations doubles, qui sont capables de rendre des services. Nous en parlerons au chapitre des *Colorations combinées*. Personnellement, j'ai trouvé ce colorant énergique et envahissant, par trop difficile à régler, et je pense qu'il n'y a pas lieu de faire grand fonds sur lui.

Le Carmin d'indigo à l'acide oxalique (THIERSCH, *Arch. f. mik. Anat.*, I, 1865, p. 150) est une solution démodée et qui paraît être superflue.

152. Le safran (BLANC, *Zool. Anzeiger*, 1883, p. 23).

153. L'orseille est une matière colorante extraite d'un lichen, la *Roccella tinctoria*. Elle donne des colorations plasmatiques.

WEDL (*Arch. f. path. Anat.*, LXXIV, p. 148) prend de l'extrait d'orseille française, le chauffe doucement au bain-marie pour chasser l'excès d'ammoniaque qui existe habituellement dans l'orseille du commerce, et l'ajoute à un mélange de 20 cc. d'alcool absolu, 5 cc. d'acide acétique d'une densité de 1.070, et 40 cc. d'eau, de manière à obtenir une solution saturée d'un rouge foncé. Il faut filtrer une ou deux fois.

Digitized by Google

On doit laver les coupes dans l'eau avant de les colorer. Pour les conserver, Wedl les monte dans de la lévulose. Les noyaux demeurent incolores, le protoplasma se colore, les cellules du tissu conjonctif se colorent d'une façon très intense, la substance intermédiaire moins. Les cellules ganglionnaires et leurs prolongements se colorent, de même que la substance fondamentale du tissu des os et des dents.

Fol (*Lehrb.*, p. 192) recommande de colorer pendant une heure dans la solution de Wedl, puis de rincer à l'alcool et de passer à la teinture complémentaire des noyaux.

154. Orcéine (Israel, *Virchow's Archiv.*, CV, 1886, p. 169 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 514). — L'orcéine est une matière colorante extraite d'un lichen, *Lecanora parella* (ne pas confondre avec l'orcine, autre dérivé du même lichen). Elle se trouve dans le commerce. D'après Israel, elle réunit en elle-même les qualités tinctoriales à la fois des couleurs « basiques » et des couleurs « acides » et donne en même temps une coloration en deux couleurs contrastées. Il colore (des coupes seulement) dans une solution contenant 2 grammes d'orcéine, 2 grammes d'acide acétique cristallisable et 100 grammes d'eau distillée, lave à l'eau, déshydrate aussi rapidement que possible dans l'alcool absolu et monte dans de l'essence de cèdre épaissie [1]. Les préparations réussies doivent montrer les noyaux bleus, le protoplasma rouge.

L'orcéine fournit en outre une coloration spécifique du tissu élastique ; nous en parlerons dans la deuxième partie.

155. Kernschwarz (Platner, *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 349). — Le Kernschwarz est un liquide noir de composition inconnue, qui est préparé en Russie et qu'on peut se procurer chez Grübler (n° 99). D'après Grübler, ce serait une solution d'une base métallique combinée à un acide organique. Platner recommandait d'y colorer des coupes pendant quelques minutes seulement (à moins que le matériel n'ait été fixé dans le liquide de Flemming, auquel cas il faudrait vingt-quatre heures), puis de différencier dans un liquide alcalin. On peut prendre pour cela de l'eau ammoniacale (5 à 6 gouttes d'ammoniaque pour un verre de montre d'eau). Mais il vaut mieux prendre une solution concentrée ou plus ou moins diluée de carbonate de lithine. On obtient, selon la durée de la décoloration, soit une coloration pure de la chromatine des noyaux, soit en même temps une coloration des éléments protoplasmiques, surtout d'un élément cyto-

[1] Israel, *Prakticum der path. Hist.*, 2 Aufl., Berlin, 1893, p. 72. Je dois cette indication à l'obligeance de M. le Dr Mayer.

Digitized by Google

plasmique des cellules glandulaires que Platner appelle « Nebenkern » (ne pas confondre avec le Nebenkern des spermatocytes). On déshydrate et l'on monte au baume de la manière usuelle.

En somme, Platner recommandait le Kernschwarz à titre de colorant de la chromatine. J'ai déjà dit ailleurs que, d'après mon expérience, il ne me semblait pas avoir des qualités très spéciales à cet égard. Après une expérience plus étendue j'ajoute maintenant qu'envisagé *comme colorant plasmatique*, le Kernschwarz me paraît être un réactif des plus importants. C'est en tout cas un des colorants plasmatiques les plus utiles et les plus instructifs que je connaisse, — je ne dis pas un des plus beaux, car la coloration teinte neutre, très sobre, qu'il fournit n'a rien de flatteur pour l'œil. Je l'emploie comme suit : les coupes, collées sur porte-objet (de matériel fixé au mélange de Flemming, je n'ai pas réussi avec du matériel au sublimé) sont traitées par le Kernschwarz jusqu'à ce qu'elles accusent une teinte gris-jaune légère. (Si le matériel est frais et que le Kernschwarz soit frais aussi, cela peut arriver en quelques secondes ; en ce cas, il sera prudent d'allonger le Kernschwarz d'une dizaine de volumes d'eau, car il est important de ne pas surcolorer. Si le matériel est vieux (de quelques mois ou années) et si la provision de Kernschwarz est également vieille, il sera peut-être nécessaire de colorer pendant vingt-quatre heures). Je renonce à la différenciation alcaline, qui est inutile si l'on a soin de ne pas surcolorer. Après coloration, on rince à l'eau et l'on colore pendant dix-huit à vingt-quatre heures ou jusqu'à quarante-huit heures dans soit la safranine anilinée de Babes ou de Zwaardemaker, soit dans le violet gentiane, le bleu Victoria ou un autre colorant de la chromatine qu'on préfère. On lave à l'alcool pur ou très légèrement acidulé par l'acide chlorhydrique et l'on monte au baume selon la méthode usuelle pour les teintures d'aniline. On doit obtenir ainsi une coloration double presque parfaitement pure. C'est-à-dire que la chromatine des noyaux (ainsi que leurs nucléoles) doit montrer le rouge de la safranine sans aucun mélange important du gris du Kernschwarz, et que l'élément plastinien des noyaux et du cytoplasme doit être d'un gris-brun plus ou moins foncé sans aucun mélange du rouge de la safranine. L'enchylème, soit l'hyaloplasme, des noyaux et du cytoplasme, est totalement ou presque totalement incolore ; diverses enclaves du cytoplasme sont assez fortement colorées, ainsi que le Nebenkern des spermatocytes. J'ai expliqué ailleurs (*La Cellule*, t. XI, 1er fasc., mars 1895, p. 31) que cette méthode est la seule qui m'ait permis de colorer avec certitude les vestiges de fuseaux en régression. C'est ce que j'ai trouvé de mieux pour ce

Digitized by Google

genre de recherches, et je pense que c'est une méthode d'une application assez générale.

156. Autres teintures végétales. — Les suivantes sont les unes mauvaises, les autres superflues : le **tournesol** (LAWSON-TAIT, *Journ. of Anat. and Physiol.*, IX, p. 250) ; le **chou rouge** (LAWSON-TAIT) ; le **Myrtillus**, extrait de baies de Myrtilles (LAVDOWSKY, *Arch. f. mik. Anat.*, XXIII, 1884, p. 506) ; la **Ribésine**, extrait de baies de cassis (FOL, *Lehrb.*, p. 184) ; la **Nucine**, soit brou de noix (LÉON, *Zool. Anz.*, 1888, p. 624).

Digitized by Google

CHAPITRE IX

DES COULEURS DE LA HOUILLE

ET DES COLORATIONS RÉGRESSIVES

157. — Nous renvoyons aux traités de Chimie et de Teinturerie pour tout ce qui regarde la chimie si compliquée de ces nombreux corps colorants. Le lecteur trouvera du reste un exposé succinct mais admirablement fait de ce sujet difficile dans GIERKE, *Færberei zu mik. Zwecken* (*Zeit. f. wiss. Mikroskopie*, II, 1885, p. 21 à 36, et 164 à 183). Nous nous bornons à donner ici une classification abrégée de ces corps, qui pourra servir à guider l'étudiant dans ses lectures, et un tableau des solubilités et réactions histologiques des principales couleurs de la houille employées en histologie, qui pourra avoir une utilité pratique. Nous avons combiné ces tableaux d'après le travail précité de Gierke, et d'après les tableaux donnés par GRIESBACH (*Arch. f. mik. Anat.*, XXII, p. 134), par HARRIS (*Quart. Journ. Mic. Science*, XC, 1883, p. 301), et d'après les *Tabellen* de BEHRENS, et d'autres sources.

158. CLASSIFICATION DES **Couleurs de la houille.**

Les couleurs de la houille se divisent en trois groupes principaux, comprenant : 1° les dérivés de l'**Aniline** ; 2° les dérivés de la **Naphtaline**, et 3° les dérivés de l'**Anthracène**.

Le groupe des **Anilines** (y compris la Safranine, qui dérive non de l'Aniline, mais de son homologue la Toluidine) peut être subdivisé de la manière suivante :

1. Produits de l'oxydation de l'Aniline : — Noir d'aniline, Induline, Nigrosine, Bleu de méthylène.
2. Produits de l'oxydation de la Toluidine : — Safranine.
3. Produits de l'oxydation de mélanges d'Aniline et de Toluidine ; — ce sont les composés de la Rosaniline : — Fuchsine et autres.
4. Produits de la substitution des atomes d'hydrogène de la Rosaniline par les radicaux méthyle ou éthyle : — ce sont les importants violets et verts, — Dahlia, Violet de méthyle, Vert de méthyle, Vert d'iode.
5. Produits de la substitution des atomes d'hydrogène de la Rosaniline par le groupe moléculaire phényle : — Bleus d'Aniline et quelques verts qui ne sont guère employés en histologie.

Digitized by Google

6. Couleurs azoïques : — Jaunes, Brun Bismarck, etc.
7. Dérivés azotés du Phénol : — Acide picrique, Dinitrosorésorcine.
8. Couleurs oxyazoïques ; — les Tropæolines, l'Orange G, etc.
9. Les Phtaléines, obtenues par l'action de l'anhydride phtalique sur le Phénol : — Éosine.
10. Produits de l'oxydation du Phénol : — Aurine.
11. Dérivés de la base Quinoline (ou Leucol) : — Bleu de Quinoléine.

Le groupe des dérivés de la **Naphtaline** comprend :

1. L'Amidoazonaphtaline : — Rose de naphtaline (ou Rouge de Magdala).
2. Les azo-composés des deux Naphtols (α et β Naphtol) : — les Bordeaux, les Tropæolines, Ponceau, et autres rouges ; avec d'autres dérivés qui ne trouvent pas d'emploi en histologie.

Le groupe des dérivés de l'**Anthracène** comprend les Alizarines et les Purpurines artificielles.

TABLEAU

DES COULEURS DE LA HOUILLE EMPLOYÉES EN HISTOLOGIE, AVEC LEURS SOLUBILITÉS ET PROPRIÉTÉS HISTOLOGIQUES

SUBSTANCE	SOLUBILITÉ	COULEUR	OBSERVATIONS
GROUPE DES ANILINES			
1[1]			
Noir d'aniline (Noir de Colin; Nigraniline, Aniline blue black.)	Insoluble à l'eau, soluble dans le phénol et l'aniline.	Noir.	Employé vraisemblablement par Luys et d'autres pour coupes de cerveau durci à l'acide chromique (mais voyez n° 203).
Les Indulines (Induline, Nigrosine, Bengaline, Indigo artificiel, Bleu noir, Blackley-blue).	Eau et alcool, selon l'étiquette.	Bleu.	Induline, marque bleue, nigrosine nuance plus noire. Voyez 172 et 202.
Bleu de méthylène.	Eau et alcool.	Bleu.	Voyez 172 et 180 à 188.
Thionine (Violet de Lauth).	Eau.	Violet.	Homologue du bleu de méthylène. N° 172.
2			
Safranine.	Eau et alcool.	Rouge.	Très important. Voyez n° 167.
Mauvéine.	?	Violet.	172. Ne se fabrique plus.

[1] Les chiffres dans cette colonne renvoient aux subdivisions de la liste donnée dans le paragraphe précédent.

Digitized by Google

SUBSTANCE	SOLUBILITÉ	COULEUR	OBSERVATIONS
GROUPE DES ANILINES			
Rouge neutre (Neutralroth).	Eau.	Rouge.	Colorations vitales. 192.
3			
Fuchsine (rouge d'aniline, Rubine, Roséine, Magenta, Solférino, Coralline, Azaléine), ces sels sont des couleurs « basiques ».	Selon l'étiquette.	Rouge.	On appelle « Fuchsine » toute une série de sels de Rosaniline. Le produit commercial est un mélange des sels de deux bases, rosaniline et pararosaniline. Le violet Magenta, la fuchsine V, la cerise, le cardinal, l'amaranth, sont des mélanges de Magenta avec d'autres couleurs. Voyez n° 172.
Fuchsine acide (Saürefuchsin, Fuchsin S. Saürerubin, Magenta S., Magenta acide, Rubine S., Rubine acide), dans laquelle le principe colorant est un *acide*, au lieu d'être une base comme dans la Fuchsine ordinaire. On peut s'en procurer chez le Dr Grübler, 17, Dufourstrasse, Leipzig. N'est fabriquée que par la Badische Anilin und Soda Fabrik.	Eau.	Rouge.	Tous ces noms sont des synonymes. La fuchsine acide est le sel de sodium de la rosaniline disolfoconjuguée; elle se présente sous des nuances plus violettes ou plus jaunes selon les procédés de fabrication. Colorant plasmatique très important, n° 189.
4			
Violet de méthyle. (Violet de méthylaniline, Violet de Paris.)	Eau et Alcool.	Violet.	Réactif pour matière amyloïde, et pour Bactéries : voyez aussi n°s 172, 179.
Violet B.	Eau.	Violet.	Colorant spécifique des vaisseaux du tissu conjonctif et adipeux (Mayer, S), voyez n° 199.
Violet de Gentiane. (Chimiquement le même corps que Violet B, plus un corps inactif.)	Eau et alcool.	Violet.	*L'un des plus importants* des colorants des noyaux. Stable (Flemming). Important pour Bactéries (Weigert, Ehrlich), voyez n° 168.

Digitized by Google

SUBSTANCE	SOLUBILITÉ	COULEUR	OBSERVATIONS
GROUPE DES ANILINES			
Dahlia (Primula. — « Violets de Hofmann »).	Eau et alcool.	Violet-bleu.	Dahlia, nuance bleue, Primula, nuance rose; utile. Spécifique pour cellules plasmatiques (Mastzellen)-(Ehrlich). Colorant nucléaire : voyez n° 169.
Bleu Victoria.	Eau et alcool.	Bleu.	Colorant nucléaire important. Spécifique pour fibres élastiques, n° 170.
Vert d'iode.	Eau et alcool.	Vert.	Bon colorant histologique, résistant à l'alcool, mais ne se fabrique plus, et n'est plus employé en histologie.
Vert de méthyle (ou Vert Lumière), Lichtgrün, Grünpulver, Vert de Méthylaniline. Le synonyme de « vert lumière » se doit plutôt rapporter au vert d'Iode (Benedikt), et pour le Lichtgrün, voyez à la subdivision suivante (5).	Eau et alcool.	Vert.	Réactif **le plus électif** pour les **noyaux** des tissus frais. Très important. N° 174.
5			
Bleus de Rosaniline.			
Bleu de Lyon (Bleu de Nuit, Grünstichblau, Bleu opal).	Alcool.	Bleu.	Colorant n'affectant pas les noyaux, n° 200.
Bleu de toluidine (Bleu de Parme, Lichtblau, Bleu alcool, Bleu gentiane).	Eau et alcool.	Bleu.	Ces marques sont des mélanges de dérivés de la rosaniline plus ou moins « substitués ». Voyez n°s 172 (bleu de toluidine) et 200.
Bleus de triphényl-rosaniline (Bleu de méthyle, bleu coton, Wasserblau, waterblue). Bleu de Chine, bleu soluble.	Eau.	Bleu.	Le Wasserblau est un colorant plasmatique d'une certaine importance, n° 201.
Vert malachite (Vert diamant, Solid green, Victoria green, New green, Benzol green, Benzoyl green, Fast green).	Eau.	Vert.	N° 197.

Digitized by Google

SUBSTANCE	SOLUBILITÉ	COULEUR	OBSERVATIONS
GROUPE DES ANILINES			
Lichtgrün F. S., Light green S ou S. F., Acid green S. O. F., Acid green.	Eau et alcool.	Vert.	Colorant plasmatique *important*. Sel sodique de l'acide diethyldibenzyldi-amidotriphénylcarbinol trisulfonique, et ne pas à confondre avec le vert malachite, ni avec le vert de méthyle. N°s 174, 196.
6			
Brun Bismarck (Vésuvine, Manchester-brown, La Phénicienne, Phenylenbraun, Brun de phénylène, Brun d'aniline, Cannelle, la Phénicienne).	Eau et alcool.	Brun.	Colorant assez électif pour les noyaux; assez stable. Très utile surtout pour les tissus frais. Le brun Bismarck est le chlorhydrate de triamidoazobenzine; mais toutes les marques du commerce sont des mélanges de ce sel avec d'autres produits, lesquels sont pour la plupart insolubles. N° 172, 178.
Echtgelb, Saüregelb (jaune solide, jaune acide).	Eau.	Jaune.	N° 194.
Orange III, Gold-orange.	Eau.	Jaune.	N° 194.
7			
Acide picrique.	Eau et alcool.	Jaune.	*Une des plus utiles des teintures des substances intercellulaires*. N° 195.
Dinitroso-resorcine (Echtgrün; Vert solide, Vert d'Alsace, Dark-green, Resorcin-green).	Eau (peu) et alcool.	Vert.	Colorant plasmatique. N° 197.
8			
Tropæoline O (Chryséoline).	Eau bouillante.	Rouge-jaune.	Différencie bien les tissus. Résiste à l'alcool.
Tropæoline OOO n° 1 (Orange 1).	Eau.	Rouge.	Colorant très électif pour noyaux, pour tissus frais ou durcis. Résiste à l'alcool. N° 194.
Tropæoline OOO n° 2 (Orange 2, Betanaphtol orange).	Eau.	Rouge-jaune.	Coloration comme la précédente, mais ne résistant pas à l'alcool. Paraît devoir être utile pour le procédé régressif. N° 172.

Digitized by Google

SUBSTANCE	SOLUBILITÉ	COULEUR	OBSERVATIONS
GROUPE DES ANILINES			
Orange G. (Sel de sodium de l'acide anilinazo B., Naphtol-disulfonique). Fabrication de Meister, Lucius et Brüning à Höchst-u-M., et de l'Actiengesellschaft f. Aniline fabrication à Berlin. Se trouve chez Grübler.	Eau.	Orange.	La solution aqueuse possède une réaction acide. *Couleur importante.* Colorant de la chromatine par régression, mais surtout employé dans les « colorations combinées ». Voir à ce chapitre, les méthodes de Flemming et de Ehrlich-Biondi.
Ecarlate impérial, Nouveau rouge (Biebricher Scharlach).	Eau.	Rouge écarlate.	Diffus. Résiste à l'alcool. N° 194.
Roccelline (« Echtroth, » Rubidine, Orseilline n° 3, Rauvarienne).	Eau et alcool.	Rouge	Bon colorant régressif, surtout pour tissu osseux. N° 172.
Croséine.	Eau.	Ecarlate.	Très utile, pour objets alcooliques ou chromiques, surtout tissus glandulaires et conjonctifs.
Xylidinponceau (Ponceau R.)	Eau.	Rouge.	Ne colore pas les objets chromiques; ne résiste pas à l'alcool.
Ponceau RR. (Isomère de l'écarlate impérial).	Eau.	Rouge.	Plus électif que le précédent; résiste à l'alcool; ne colore pas les objets chromiques. N° 194.
Bordeaux R.	Eau.	Rouge.	Colorant électif pour noyaux, surtout utile pour tissus glandulaires et conjonctifs, par voie progressive. Colore les objets chromiques; résiste à l'alcool. N° 194.
Bordeaux G.	Eau chaude.	Rouge.	Mêmes réactions que le précédent. N° 194.
Rouge Congo.	Eau.	Rouge.	Colorant « vital » et nerveux. N° 190.
Benzopurpurine, Benzopurpurine B., Deltapurpurine.	Eau.	Rouge.	Pour ces trois couleurs voir n° 191.
Benzoazurine.	Eau.	Bleu.	Colorant surtout nucléaire, progressif ou régressif. N° 172.

Digitized by Google

SUBSTANCE	SOLUBILITÉ	COULEUR	OBSERVATIONS
GROUPE DES ANILINES			
9			
Les Éosines.			
Eosine soluble à l'eau (Primerose soluble).	Eau et alcool dil.	Rouge.	Ce sont d'énergiques colorants diffus. Utiles surtout pour les colorations combinées.
Eosine soluble à l'alcool (Eosine alcoolique), Rose Bengale, Erythrosine, Pyrosine, Phloxine, Safrosine, etc.	Alcool.	Rouge.	N° 193.
10			
Aurine, Benzaurine, Coralline jaune, Coralline rouge, Pæonine.			Toutes inutiles.
11			
Bleu de quinoléine (Cyanine, Chinolinblau).	Alcool.	Bleu.	Colorant spécifique des graisses. Colorant des Infusoires *intra vitam*. Voyez n° 198.
GROUPE DES COULEURS DE NAPHTALINE			
1			
Rose de naphtaline. (Rosa-naphthylamine, Rouge de naphtaline, Magdala). Cette couleur peut également être classée près de la safranine.	Eau chaude et alcool.	Rouge.	L'un des meilleurs des colorants des noyaux par voie régressive. (FLEMMING). N° 172.

160. Classification cytologique des couleurs. — On rencontre fréquemment dans la littérature une classification histologique (ou mieux, cytologique) des couleurs de la houille, due à EHRLICH (*Verh. d. Berl. phys. Gesellsch.*, 16 mai 1879 ; — dans *Reichert u. du Bois-Reymond's Arch. f. Anat. u. Phys.*, *Phys. Abth.*, 1879, p. 571).

D'après Ehrlich, les « *couleurs basiques* », ou couleurs dans lesquelles la substance colorante joue le rôle de base combinée avec un acide incolore, possèdent en général une tendance à se localiser d'elles-mêmes et directement dans les noyaux ; — tandis que les « *couleurs acides* », ou couleurs dans lesquelles la substance colorante proprement dite joue le rôle d'un acide dans la combinaison, colorent d'une manière diffuse, ou se localisent principalement dans le cytoplasma et les substances intercellulaires. (Pour un exemple de cette distinction en couleurs *basiques* et *acides*, voyez *Fuchsine Acide*, n° 189.)

A ces deux groupes principaux on peut ajouter un petit groupe de *cou-*

Digitized by Google

leurs neutres. Bien peu des couleurs du commerce possèdent la constitution chimique qui les placerait dans ce dernier groupe ; Ehrlich admet qu'il s'en forme lorsqu'on mélange les solutions d'une couleur basique et d'une couleur acide. Ces corps neutres seraient insolubles dans l'eau pure, et se précipitent lorsqu'on fait le mélange, mais se dissolvent si l'on ajoute un excès de la couleur acide. Ils auraient des affinités spéciales pour certaines enclaves cellulaires.

Nous aurions donc ainsi trois groupes de couleurs, qui seraient définis en même temps par leur constitution chimique et par leurs affinités cytologiques :

Nous aurions les couleurs *basiques* (dans le sens ci-dessus donné à ce mot, ce qui n'implique nullement une réaction alcaline de la solution du corps en question), qui seraient des colorants de la chromatine, ou des colorants nucléaires ; — les couleurs *acides*, qui seraient des colorants *plasmatiques ;* puis les couleurs *neutres*, qui seraient des colorants *spécifiques* pour certains éléments des cellules. Mais il semble que la généralisation d'Ehrlich, sans doute fort exacte au point de vue théorique, ne se laisse pas appliquer sans beaucoup de restrictions aux réalités de la technique. Nous avons à tenir compte dans la pratique non seulement des affinités de la couleur pour tel ou tel élément comme elles se révèlent à la teinture *progressive;* il nous faut aussi tenir compte de la résistance de la couleur aux liquides de lavage et de déshydratation et éclaircissement, en un mot, de sa manière de se comporter à la teinture régressive. Et cela est ici particulièrement important parce que, en effet, l'emploi principal des couleurs de la houille se trouve dans la coloration par voie *régressive* de coupes destinées à être déshydratées par l'alcool et montées au baume. Or les expériences d'Ehrlich ne tiennent pas compte de ces conditions. Elles ont été faites avec des cellules isolées, étalées en couche mince sur des verres à couvrir, et sans emploi d'alcool pour la déshydratation. Il en résulte que ses catégories, *couleurs basiques*, *couleurs acides*, ne correspondent pas exactement aux catégories techniques de *colorants nucléaires*, *colorants plasmatiques*.

Par exemple, l'Orange est une couleur *acide*. Mais cela n'empêche pas que, employée en teinture régressive, elle ne se montre comme colorant nucléaire donnant une coloration très précise de la chromatine et des nucléoles plasmatiques. La Fuchsine acide, ou Säurefuchsine, est une couleur très acide. Elle se montre en général comme colorant plasmatique très franc ; mais quelquefois à la teinture régressive (il est vrai que ce n'est que rarement et dans des conditions qu'on ne peut pas préciser) elle donne de vigoureuses colorations nucléaires. La Safranine est une couleur *basique;* mais par l'emploi de mordants appropriés on peut en faire un colorant plasmatique. Il y a même bien des marques de Safranine qui ne fournissent jamais, même sans mordançage, des colorations n'intéressant pas le plasma au point de les rendre inutiles comme colorations nucléaires. Le Bleu de méthylène est une couleur *basique*. Mais on sait qu'employé d'après la méthode d'Ehrlich pour les soi-disant colorations vitales de nerfs ou d'autres tissus, ce qu'il fournit c'est surtout une coloration plasmatique, la coloration des noyaux qui s'y présente quelquefois n'étant qu'un épiphénomène accidentel. La Nigrosine est une couleur *acide* d'après Ehrlich. Employée en teinture régressive elle m'a donné des colorations nucléaires

Digitized by Google

de toute beauté, le cytoplasme ne retenant pour ainsi dire qu'une trace de couleur. D'après Griesbach, le Bordeaux, également une couleur *acide*, est un colorant nucléaire. Il ne serait pas difficile de donner encore plusieurs exemples de ce genre.

Il semble donc que la généralisation d'EHRLICH, quelque importante qu'elle soit au point de vue de la théorie cytologique, ne suffit pas à fournir une classification des couleurs de la houille au point de vue de la technique histologique. Nous nous en tiendrons à notre classification usuelle en colorants *nucléaires* et *plasmatiques* et nous distribuerons nos couleurs dans ces cadres d'après des considérations simplement empiriques.

161. La méthode régressive de coloration ou méthode de Flemming[1]. — Bien peu des couleurs de la houille donnent de bonnes colorations nucléaires *par voie progressive* (n° 95). Il y en a deux, le vert de méthyle et le brun Bismarck, qui sont des colorants nucléaires directs de première importance. L'une de ces couleurs est d'une importance toute spéciale, ce qui fait que nous ne craignons pas de nous répéter en la signalant à l'attention du lecteur à plusieurs reprises ; c'est le *vert de méthyle*. C'est un colorant instantané, et le réactif le plus précis de la « chromatine » qui soit connu. Les solutions de cette substance devraient certainement se trouver sur toutes les tables de laboratoire. Après le vert de méthyle, nous avons à signaler le brun Bismarck ; c'est un bon colorant des noyaux par la voie directe, et très stable. Il y en a d'autres qui peuvent fournir des colorations plus ou moins électives pour les noyaux par la voie directe, mais les deux couleurs que nous venons de nommer sont sans contredit les plus importantes.

Nous réservons pour la fin de ce chapitre la considération de ces colorants directs, et nous passons tout de suite à l'exposition de la manière d'employer les couleurs, tout aussi importantes, qui ne se laissent utiliser que par *la voie régressive* (n° 95). C'est cette méthode que nous allons maintenant exposer en détail.

162. Coloration. — Des *coupes seulement*, ou des portions de tissu assez minces pour se comporter comme des coupes, des membranes par exemple, peuvent être traitées par cette méthode.

Les solutions colorantes se font avec l'alcool, l'eau ou une solution d'huile d'aniline dans l'eau (voyez plus bas, *Safranine* et *Gentiane*), selon les diverses solubilités des couleurs employées. Il n'y a pas en

[1] Le principe de cette méthode est due à HERMANN et BOETTCHER ; mais elle est universellement connue sous le nom de FLEMMING, à qui revient le mérite d'en avoir amélioré et réglé la pratique en des points essentiels. Pour nous conformer à la tradition usuelle nous lui conservons le titre de « Méthode de Flemming ».

Digitized by Google

général de motif spécial pour employer l'alcool si l'eau peut suffire ; le point essentiel est d'obtenir une *solution très forte.* L'alcool à 50 p. 100 est très souvent employé. Les coupes doivent être *très fortement colorées* dans la teinture. En règle générale on ne saurait les y laisser trop longtemps ; car plus elles sont fortement colorées et mieux elles résistent à la décoloration, ce qui est un avantage. Avec les puissantes teintures obtenues au moyen de l'huile d'aniline, il suffit souvent d'un bain de quelques minutes ou une demi-heure, mais il est souvent bon d'y laisser les coupes de douze à vingt-quatre heures ou plus. Les objets préparés dans le mélange de FLEMMING ou dans celui de HERMANN sont ceux qui donnent les plus beaux résultats ; mais le matériel au sublimé, etc., peut être employé. Pour les recherches sur les noyaux il vaut mieux n'employer les teintures anilinées qu'avec du matériel bien fixé dans un liquide chromo-osmique ; car l'huile d'aniline est une base assez énergique pour altérer la chromatine si celle-ci n'a pas été parfaitement bien fixée.

Avant de procéder à la décoloration il est toujours bon de *rincer* les coupes dans l'eau, quelquefois même de les y *bien laver*, cela aide à fixer la couleur. Pour les procédés de *mordançage*, voyez aux nos 96 *bis*, 171 *bis*, 171 *ter*.

163. Décoloration. — Les coupes traitées comme ci-dessus se trouvent être *surcolorées*, c'est-à-dire colorées d'une manière à la fois excessive et diffuse. Il s'agit maintenant de produire l'élection voulue par la différenciation de cette coloration diffuse ; il faut les décolorer jusqu'à un certain point.

La décoloration se fait le plus souvent par le lavage à l'alcool, tantôt pur, tantôt acidifié par l'acide chlorhydrique. Si les coupes sont isolées (coupes à la celloïdine), on les porte dans un verre de montre d'alcool. Si elles sont montées en série sur porte-objets, on met le tout dans un tube d'alcool. Il est possible de différencier simplement en versant l'alcool sur le porte-objets ; mais il vaut en général mieux employer un tube ou autre bain. Les coupes isolées dans le verre de montre commencent aussitôt à céder leur couleur à l'alcool, sous forme de nuages qui se produisent d'abord très rapidement mais après un temps plus lentement. Les coupes sur porte-objets rendent leur couleur sous forme de rivières coulant le long du verre, ce que l'on constate plus facilement si de temps à autre on soulève la lame pour un instant au-dessus du niveau de l'alcool. Après quelque temps on constate que la formation des nuages ou des rivières de couleur paraît être *sur le point de cesser ;* les coupes sont maintenant deve-

Digitized by Google

nues pâles et un peu *transparentes*, et, dans le cas de tissus fixés aux liquides chromo-osmiques, ont *pris un autre ton de couleur*, ce qui est dû à ce que le fond général du tissu, teinté par le liquide fixateur, reparaît aux endroits d'où la couleur d'aniline a été enlevée. Par exemple, des tissus préparés au liquide de Flemming et colorés à la safranine passent d'un rouge opaque à un violet délicat. A ce moment la différenciation est complète et *doit être arrêtée instantanément*, ce qui se fait de la manière que nous disons au paragraphe suivant.

On recommande en général de prendre, pour la décoloration, de l'alcool *absolu*. Il n'y a pas de mal à cela, mais très souvent l'alcool à 95 p. 100 suffira.

Il sera en général bon de n'employer la décoloration par l'alcool à l'acide chlorhydrique (1 p. 1000 environ) qu'avec des tissus très bien fixés dans un mélange chromo-osmique ou un liquide semblable ; car cet acide peut très bien produire des gonflements dans les tissus imparfaitement fixés. Il faut observer aussi que l'acide extrait la couleur plus rapidement des noyaux au repos que de ceux qui sont en kinèse, ce qui est un avantage ou non selon le but que l'on a en vue. En thèse générale, on peut dire que le lavage doit se faire à l'alcool pur toutes les fois que l'on désire avoir les noyaux au repos colorés en même temps que ceux qui sont en kinèse ; les autres procédés de lavage servant surtout à *différencier* les kinèses.

Quant à la durée des lavages, elle varie beaucoup selon la nature des tissus et les détails du procédé que l'on met en œuvre ; peut-être pourrait-on dire qu'elle ne saurait être de moins de 30 secondes, et que le plus souvent elle n'est pas plus de deux minutes.

Un procédé très intéressant est celui de la décoloration par une deuxième teinture à couleur d'aniline. Par ce procédé la deuxième couleur se substitue à la première dans le fond général des tissus, laissant les noyaux colorés par la première teinture, ce qui produit une coloration double. Ainsi le bleu de méthylène et le violet de gentiane peuvent être enlevés des portions plasmatiques par une solution *aqueuse* de vésuvine ou d'éosine ; la fuchsine peut être enlevée des portions plasmatiques par une solution *aqueuse* de bleu de méthylène, tout en laissant les noyaux en possession de la première couleur. Flemming a obtenu des résultats importants en différenciant des coupes colorées au violet de gentiane dans une solution aqueuse d'orange (voyez pour tous ces procédés au chapitre des *colorations combinées*). Flemming paraît attribuer cette réaction à la nature *acide* de l'orange. C'est possible ; l'orange est une couleur *acide* dans le sens chimique, et sa solution dans l'eau a une réaction acide. Je ne puis pas dire jusqu'à quel point la nature *acide* des couleurs dans le sens chimique leur peut prêter une action décolorante sur les couleurs basiques ou moins acides. Il est certain, en tout cas, que les couleurs *basiques* peuvent servir

Digitized by Google

de décolorants ; nous en avons donné deux exemples tout à l'heure : — la vésuvine et le bleu de méthylène sont tous les deux des couleurs *basiques*.

Des procédés comme ceux de RESEGOTTI (*colorations combinées*) et de BENDA (Safranine suivie de Lichtgrün) n'entrent pas en ligne de compte ici parce que dans ces procédés la deuxième couleur est employée en solution *alcoolique*, de sorte que l'action décolorante peut être attribuée, en partie du moins, à la menstrue.

Dans plus d'un des procédés de différenciation qui seront décrits plus loin, un traitement par l'acide chromique ou par l'iode intervient. Je pense que ces corps agissent en mordançant la chromatine, ce qui lui permettrait de retenir avec plus d'énergie la couleur qu'elle aurait absorbée à la teinture. Nous savons d'un côté que l'acide chromique précipite la safranine de ses solutions ; de sorte que si nous admettons d'un autre côté que la chromatine ait une affinité spéciale pour cet acide (surtout la chromatine à l'état kinétique) l'explication serait complète. Comparez aussi ce que nous avons dit au n° 162 *bis*.

164. Éclaircissement. — La différenciation étant complète, la décoloration doit être arrêtée immédiatement, comme nous l'avons dit. Il suffit pour cela de mettre les coupes dans de l'eau ; mais la pratique usuelle est d'éclaircir et monter tout de suite.

On peut éclaircir par l'essence de girofle, *qui enlèvera encore de la couleur aux tissus*. Ou bien on peut employer un éclaircissant qui soit sans action sur la couleur (essence de cèdre, de bergamote, xylol, toluol, et d'autres, voyez au chapitre AGENTS ÉCLAIRCISSANTS). Si l'on a décoloré à l'alcool pur, il est souvent préférable d'employer l'essence de girofle, parce que l'alcool pur n'enlève pas toujours parfaitement la couleur aux portions plasmatiques, surtout si la coloration a été longue. Mais si elle ne l'a pas été, et surtout si l'on a décoloré à l'alcool acidifié, l'essence de girofle ne sera pas nécessaire, et du moment qu'elle n'est pas nécessaire il vaut mieux ne pas l'employer, car elle diminue quelque peu le brillant de la coloration. Cette essence a la propriété particulière de décolorer la chromatine des *noyaux au repos plus rapidement* que celle des noyaux en kinèse, ce qui fait qu'elle aide à un degré important à la *différenciation des mitoses*.

Certaines couleurs sont beaucoup plus sensibles à l'action de l'essence de girofle que d'autres. Il faut aussi tenir compte de la qualité de cette essence si fréquemment falsifiée. L'essence fraîche décolore plus rapidement que la vieille.

Des séries de coupes montées sur porte-objets se laissent éclaircir commodément en les inondant de l'agent éclaircissant.

Lorsque l'éclaircissement a été obtenu, on monte au baume ; ou bien si l'on ne désire pas monter tout de suite et que l'on ait employé

Digitized by Google

l'essence de girofle, il faut arrêter la décoloration en transportant les coupes dans un milieu qui n'attaque plus la couleur (xylol, essence de cèdre, etc.).

Pour le montage il faut éviter les solutions faites au chloroforme, ce corps attaquant souvent la couleur.

165. Résultats généraux. — Le résultat final dépend beaucoup du traitement préalable des tissus. Si vous leur avez fait subir une fixation prolongée dans le mélange *fort* de Flemming, et si vous avez décoloré à l'alcool acidifié et éclairci à l'essence de girofle, il ne restera en général de coloré que les nucléoles plasmatiques et la chromatine des noyaux en kinèse, la chromatine des noyaux au repos s'étant décolorée. Si vous avez donné une fixation plus légère, soit avec le mélange *faible* de Flemming, soit avec un autre fixateur favorable à la coloration, et que vous ayez décoloré à l'alcool pur, la chromatine des noyaux au repos demeurera colorée. Si l'on n'a décoloré que fort légèrement, le protoplasma demeurera coloré.

166. Choix d'une teinture d'aniline. — Dans les couleurs basiques, c'est la safranine et le violet de gentiane qui sont les couleurs les plus employées, tant sous le rapport de l'énergie et la précision de la coloration que sous celui de sa permanence. J'y ajoute volontiers le bleu Victoria qui m'a toujours donné d'excellents résultats sous tous les rapports. On peut prendre l'une ou l'autre de ces couleurs selon qu'on désire avoir une coloration rouge ou bleue. La safranine sera souvent à préférer s'il ne s'agit que d'une coloration simple. Elle donne aux forts grossissements de bonnes images tant à l'éclairage du jour qu'à l'éclairage artificiel. Tandis que j'ai toujours remarqué que le violet de gentiane (et la plupart des bleus) donnent à la lampe des images dichroïques qui ne sont pas favorables à une bonne définition.

Il est une autre considération qui peut influer sur le choix. Quelques-unes de ces couleurs donnent une coloration *mate;* il en est ainsi pour le violet de gentiane, à tel point que dans les fortes colorations les chromosomes et nucléoles plasmatiques paraissent parfaitement opaques. Cela est favorable à la définition des limites de ces éléments, mais défavorable à la transparence des préparations ; de telles colorations ne sont à préférer que pour des *coupes très minces.* La safranine, le vert d'aniline, l'orange et quelques autres couleurs donnent une coloration *transparente* de ces éléments. C'est certainement un avantage pour des coupes tant soit peu épaisses ; mais cette

Digitized by Google

transparence n'est pas favorable à la bonne définition d'objets difficiles, car elle donne lieu à la formation de lignes de diffraction. La coloration de la safranine n'est cependant pas d'une transparence excessive, et donne de bons résultats sous ce rapport.

S'agit-il de faire des colorations doubles, les bleus seront souvent à préférer comme colorants nucléaires. Car il y a plusieurs rouges qui sont de bons colorants plasmatiques, mais dans les bleus, pour autant que j'aie pu le constater, il n'y en a que peu ou point de satisfaisants. Après un bleu (ou plutôt avant) vous pouvez employer la fuchsine acide, le Congo, l'éosine, etc. Tandis qu'après la safranine je ne connais guère que le Kernschwarz que je puisse recommander comme colorant plasmatique.

Digitized by Google

CHAPITRE X

SAFRANINE ET AUTRES COLORANTS NUCLÉAIRES

A. — Colorants régressifs

167. Safranine. — Colorant de premier ordre, énergique, brillant, très électif, parfaitement permanent dans le baume.

La condition première de la réussite dans les teintures à la safranine est *de posséder une bonne marque de safranine*. Nous insistons ici de nouveau sur ce que nous avons dit au numéro 99; — avant de se mettre à travailler avec ce réactif il convient de s'adresser à Grübler ou un autre des fournisseurs que nous avons cités et commander une provision de la couleur en spécifiant l'emploi pour lequel elle doit servir, si c'est pour la coloration nucléaire en général, ou si c'est pour des colorations spécifiques de fibres élastiques ou pour autre emploi.

Il y a dans le commerce au moins une vingtaine de marques de safranine, qui diffèrent à un degré important sous les rapports de la couleur, du poids, de la solubilité et surtout sous le rapport des colorations qu'elles fournissent. Les unes sont facilement solubles dans l'eau, mais pas dans l'alcool; pour d'autres c'est le contraire; quelques-unes sont facilement solubles dans les deux menstrues. Resegotti (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 320) en a étudié quatorze marques. Celle dont je me sers depuis longtemps et qui donne de bons résultats est la « Safranine O » de Grübler. Il faut se rappeler que, comme les procédés de fabrication changent continuellement, les résultats ne seront nullement toujours identiques.

Coloration.

Bon nombre de safranines ne sont pas suffisamment solubles dans l'eau, ce qui oblige à l'emploi d'autres menstrues.

Digitized by Google

La solution de PFITZNER (*Morph. Jahrb.*, VI, p. 478, et VII, p. 291) se compose de 1 partie de safranine, 100 d'alcool absolu et 200 d'eau, cette dernière n'étant ajoutée qu'au bout de quelques jours.

La solution de FLEMMING (*Arch. f. mik. Anat.*, XIX, 1881, p. 317) consiste en une solution concentrée dans l'alcool absolu, allongée de moitié d'eau.

Les solutions de BABES (*op. cit.*, 1883, p. 356) sont (A) un mélange à parties égales d'une solution concentrée dans l'alcool et d'une solution concentrée dans l'eau (j'ai trouvé cela excellent), puis (B) une solution aqueuse sursaturée faite à l'aide de la chaleur.

La *solution anilinée* de BABES (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 4, 1887, p. 470) consiste en 100 parties d'eau, 2 parties d'huile d'aniline et un excès de safranine. Babes chauffe le mélange à 60 ou 80° C. et filtre à travers un filtre humide. Cette solution pourra être conservée pendant un mois ou deux.

La solution de ZWAARDEMAKER (*op. cit.*, IV, 2, 1887, p, 212) est un mélange à parties égales de solution alcoolique de safranine et d'eau anilinée. L'eau anilinée se fait en agitant un peu d'huile d'aniline avec de l'eau qu'on filtre ensuite. Je me trouve très bien de cette solution.

On admet que l'aniline dans ces liquides sert de mordant et permet de raccourcir notablement la durée de la teinture.

On peut employer n'importe laquelle de ces teintures avec n'importe lequel des procédés de décoloration qui vont suivre. Nous rappelons ce qui a été dit au sujet de l'emploi de l'huile d'aniline au numéro 162.

Décoloration et Eclaircissement.

Pour les règles générales à ce sujet voyez ci-dessus, n°s 163, 164.

Méthode de FLEMMING (Première Méthode). Alcool pur (« extraction neutre »), suivi d'essence de girofle. Les noyaux au repos sont colorés en même temps que les noyaux en kinèse.

Méthode de FLEMMING (Deuxième Méthode, « Extraction acide ») (*Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 3, 1884, p. 350). Décolorer, jusqu'à ce que les coupes ne cèdent presque plus de couleur, dans de l'alcool contenant 0,5 p. 100 d'acide chlorhydrique, achever la déshydratation dans l'alcool pur, puis traiter par l'essence de girofle. (On peut si on le préfère employer l'acide en solution dans l'eau.) La proportion d'acide indiquée paraît plus forte qu'il ne serait nécessaire, et en conséquence j'ai presque toujours employé une dose ne dépassant pas 0,2 p. 100 ;

Digitized by Google

et plus récemment, suivant un travail plus récent de FLEMMING (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 249), j'ai obtenu de bons résultats en employant une dose de 1 p. 1000 ou moins. Cette méthode suppose un matériel bien fixé dans le mélange fort de Flemming, et coloré pendant au moins plusieurs heures. PODWYSSOZKI cependant (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 3, 1886, p. 405) dit avoir réussi avec des colorations de seulement une demi-heure de durée. Cette méthode ne laisse de coloré que la chromatine en kinèse et les nucléoles plasmatiques.

La *méthode à l'orange* de FLEMMING sera décrite dans le chapitre des COLORATIONS COMBINÉES.

Une deuxième méthode de PODWYSSOZKI (*loc. cit.*) consiste à décolorer (quelques secondes à deux minutes) dans une forte solution alcoolique d'acide picrique suivie d'alcool pur. Mêmes résultats, si ce n'est qu'on obtient une coloration brunâtre au lieu de rouge. Voyez plus bas les observations d'OHLMACHER au sujet de l'emploi de l'acide picrique.

BABES recommande pour les coupes colorées dans sa solution anilinée un traitement par l'iode d'après la méthode de GRAM que nous décrirons au paragraphe du *Violet de gentiane* (n° 168). Ce procédé a aussi été recommandé par PRENANT (*Int. Monatsschr. f. Anat.*, etc., IV, 1887, p. 368) qui fait observer qu'en ce cas le traitement par l'iode doit être un peu plus long que pour les préparations au violet de gentiane, et le traitement par l'alcool un peu moins long. Mais voyez aussi OHLMACHER, ci-dessous.

MARTINOTTI et RESEGOTTI (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 328) recommandent de décolorer dans un mélange fraîchement préparé d'une partie de solution aqueuse d'acide chromique à 1 p. 1000 avec 9 parties d'alcool absolu, avec traitement subséquent par l'alcool pur et l'essence de bergamotte. D'après mon expérience les résultats que donne cette méthode ne sont pas meilleurs, je pense même moins bons, que ceux que donne la décoloration dans l'acide chromique simple suivi d'alcool, d'après BIZZOZERO (voyez au paragraphe suivant).

Ce procédé de Bizzozero est certainement excellent. GARBINI (*op. cit.*, V, 2, 1888, p. 170) a conseillé de déshydrater d'abord dans de l'alcool méthylique (esprit de bois), qui ne dissout que fort peu la safranine, puis de décolorer dans un mélange de deux parties d'essence de girofle avec une partie d'essence de cèdre. Cette méthode ne m'a pas donné de bons résultats.

Il nous reste à dire deux mots sur la différenciation à l'iode ou à l'acide picrique. Il a été démontré par OHLMACHER (*Journ. Amer. Med. Ass.*, XX, n° 5, Feb. 4, 1893, p. 111) que si des tissus colorés à la safranine sont traités ensuite par des solutions qui contiennent de l'iode ou de l'acide picrique, il s'y forme un précipité d'une substance d'un rouge foncé, de nature cristalline mais revêtant des formes lancéolées, semi-lunaires, falciformes ou navicellaires. Ce précipité se forme tant dans les tissus normaux

Digitized by Google

que dans les tissus pathologiques, et tant dans les noyaux que dans le cytoplasme. Il se forme très facilement dans les tissus carcinomateux ; et OHLMACHER a conclu que bien des corps qui ont été décrits comme « Coccidies, Sporozoaires », ou autres « parasites » des carcinomes ne sont pas autre chose que des éléments de ce précipité. Cette critique a trait, entre autres, aux travaux de PODWYSSOZKI et de SAWTSCHENKO. Si les suppositions d'OHLMACHER se vérifient, il sera nécessaire d'admettre avec lui que l'emploi de solutions contenant de l'iode ou de l'acide picrique après la safranine est fort sujet à cautions (voyez aussi un travail plus récent du même auteur, *op. cit.*, June 30, 1894).

Dans des tissus fixés au liquide de Flemming, la safranine colore, outre les noyaux, les fibres élastiques, les corps cellulaires de certains épithéliums cornés, et le contenu de certaines cellules glandulaires (la mucine entre autres).

Les solutions aqueuses acidulées par l'acide acétique donnent des colorations nucléaires *progressives* assez bonnes sur des tissus frais.

168. Violet de Gentiane. — Egalement une des plus importantes des couleurs d'aniline. C'est un colorant tout aussi précis que la safranine et encore plus énergique. On peut colorer dans une solution aqueuse simple, ou dans une solution alcoolique concentrée allongée de moitié d'eau (FLEMMING, *Zellsubst.*, etc., p. 384). On peut décolorer soit à l'alcool pur, soit (FLEMMING, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 350) à l'alcool acidifié, comme nous l'avons dit ci-dessus pour la safranine. Il y a encore une méthode excellente en ses résultats, et très commode, due à BIZZOZERO (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 1886, p. 24). — Les tissus sont fixés et durcis soit par l'alcool absolu, soit par l'acide chromique ou les mélanges chromiques de Flemming suivis d'un lavage à l'eau prolongé. Les coupes sont mises pendant cinq à dix minutes (ou plus longtemps) dans le *liquide d'*EHRLICH (violet de gentiane, 1 ; alcool, 15 ; aniline, 3 ; eau, 80), puis lavées rapidement dans l'alcool absolu, et portées dans une solution d'acide chromique à 1 p. 1000. On les y laisse pendant trente à quarante secondes, puis on les met, pendant trente à quarante secondes, dans de l'alcool absolu propre, où elles se décolorent en partie. Puis, pour mieux fixer la couleur sur les figures nucléaires, on remet de nouveau les coupes pendant trente secondes dans la solution chromique et ensuite dans l'alcool absolu. Au bout de trente à quarante secondes, on les met dans quelques gouttes d'essence de girofle, où elles perdent encore de leur couleur ; on enlève l'essence et on la remplace par de l'essence propre, puis on monte dans la résine damar.

Digitized by Google

Dans certains cas, surtout lorsqu'il s'agit de tissus dont les noyaux retiennent mal la couleur, on obtient de meilleurs résultats en combinant ce procédé avec celui qui a été indiqué par GRAM pour la coloration de micro-organismes dans les tissus (*Fortschr. d. Medicin.*, II, 1884, n° 6 ; *Brit. Med. Journ.*, 6 sept. 1884, p. 486 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, N. S., IV, 1884, p. 317), c'est-à-dire, en faisant précéder le traitement par la solution chromique par l'action d'une solution d'iode. La série des opérations est alors la suivante : 5 à 10 minutes dans le liquide d'Ehrlich ; lavage pendant 5 secondes à l'alcool absolu ; 2 minutes dans la solution d'iode (iode, 1 ; iodure de potassium, 2 ; eau, 300) ; 20 secondes dans l'alcool absolu ; 30 secondes dans la solution chromique ; 15 secondes dans l'alcool absolu ; 30 secondes dans la solution chromique pour la deuxième fois ; 30 secondes dans l'alcool absolu ; deux lavages successifs dans l'essence de girofle ; résine damar.

La deuxième méthode s'emploie surtout pour les tissus dont les noyaux se décolorent facilement (foie, glandes salivaires, reins, pancréas). Dans les préparations bien réussies, le protoplasma cellulaire est incolore ; dans les noyaux au repos, les nucléoles seuls sont faiblement colorés ; les mitoses sont d'un violet intense, presque brun.

NISSEN (*Arch. f. mik. Anat.*, 1886, p. 338) a modifié cette méthode en supprimant le traitement par l'acide chromique.

Nous avons déjà fait observer que le violet de gentiane donne des colorations extrêmement énergiques et d'une nature *opaque*. Il en résulte qu'il convient mieux pour des coupes très minces que pour celles qui ne le sont pas. La coloration se conserve bien dans le baume ; mais j'engage à laisser les préparations le moins possible à la lumière.

Les solutions aqueuses acidulées par l'acide acétique (à 1 p. 100 par exemple) sont des colorants nucléaires *progressifs* pour le tissu frais. La couleur dissoute dans un liquide « indifférent » est une des plus utiles pour les soi-disant « colorations vitales ». Pour l'emploi de cette couleur en combinaison avec d'autres, voyez au chapitre des *Colorations combinées*.

169. Dahlia (FLEMMING, *Arch. f. mik. Anat.*, XIX, 1881, p. 317). — Colorer dans une solution aqueuse, soit neutre, soit acidifiée par l'acide acétique, et décolorer à l'alcool pur. La coloration de la chromatine est bonne, mais moins forte qu'avec la gentiane ou la safranine. Les granulations cytoplasmiques de certaines cellules sont nettement colorées.

Pour les tissus *frais*, on peut selon EHRLICH (*Arch. f. mik. Anat.*, XIII, 1876, p. 263) employer le dahlia de deux manières. On peut

Digitized by Google

colorer dans une solution aqueuse neutre qui donne une coloration uniforme de tous les éléments, excepté des noyaux ; en traitant alors les préparations par l'eau acidulée avec de l'acide acétique, la couleur se retire des tissus et se localise dans les noyaux. Ou bien on peut obtenir la coloration directe des noyaux en employant une solution concentrée de dalhia dans de l'eau acidulée avec 7,5 p. 100 d'acide acétique.

Pour la coloration spécifique des cellules à granulations (Plasmazellen) d'EHRLICH, voyez à la deuxième partie.

Le dahlia sert très bien pour les colorations « vitales » comme nous l'avons dit ci-dessus pour le violet de gentiane.

170. Bleu Victoria (LUSTGARTEN *Med. Jahrb. k. Ges. d. Aerzte zu Wien*, 1886, p. 285-91). — Colorer dans une solution concentrée dans l'eau. Le matériel fortement fixé dans le liquide de FLEMMING demandera plusieurs heures, du matériel légèrement fixé seulement quelques minutes. Décolorer à l'alcool pur (environ une minute). On peut éclaircir à l'essence de girofle, mais il vaut en général mieux prendre l'essence de cèdre ou de bergamote, car l'essence de girofle extrait la couleur très rapidement. La couleur est peu résistante à l'alcool. J'ai trouvé que la résistance en est beaucoup augmentée si l'on mordance les coupes avant coloration en les traitant pendant un quart d'heure par la teinture d'iode. La décoloration à l'acide chlorhydrique est absolument à éviter.

Le bleu Victoria est un colorant nucléaire brillant et précis, et après le mordançage par l'iode très facile à contrôler. Il me semble qu'il est souvent à préférer au violet de gentiane comme donnant des colorations moins opaques.

Dans ces préparations la mucine est colorée au même titre que la chromatine.

Cette couleur a une affinité spécifique pour les *fibres élastiques*. Pour les différencier il est nécessaire d'employer du matériel fixé dans un liquide chromique ou chromo-osmique, et de colorer très longtemps. LUSTGARTEN recommande à cet effet une solution alcoolique allongée de deux à quatre volumes d'eau.

171. Méthode au Permanganate (HENNEGUY, *Journ. de l'Anat. et de la Physiol.*, XXVII, 1891, p. 397). — Il a été établi par HENNEGUY que le permanganate de potasse agit comme mordant pour plusieurs couleurs d'aniline, et permet de réaliser de bonnes colorations dans des cas où les procédés ordinaires échouent.

Digitized by Google

On emploie du matériel fixé au liquide de Flemming fort, qu'on ne laisse agir que quelques heures (deux à six heures selon les dimensions de l'objet). Les coupes, collées sur porte-objets par l'albumine de Mayer, sont traitées pendant cinq minutes par une solution de permanganate de potasse à 1 p. 100. On lave à l'eau et l'on passe au bain de teinture dans la safranine, rubine, violet de gentiane, vésuvine, etc.

La couleur qui réussit le mieux est la safranine préparée avec de l'eau d'aniline et de l'alcool absolu.

Les coupes doivent séjourner dans la solution colorante un temps environ moitié moindre que si elles n'avaient pas été au préalable traitées par le permanganate. La préparation se termine à la manière ordinaire au moyen de l'alcool absolu et de l'essence de girofle.

La décoloration est la partie la plus délicate de la méthode, aussi est-il nécessaire d'en suivre les progrès sous le microscope. Elle marche en général assez lentement, et la coloration sera d'autant plus élective que la décoloration aura duré plus longtemps. Celle-ci continue quelquefois lorsque les coupes sont montées dans le baume, surtout s'il reste sous la lamelle des traces d'essence de girofle. Des préparations qui, au moment où elles étaient montées dans le baume, étaient trop fortement colorées ont présenté souvent, vingt-quatre et quarante-huit heures après, une coloration élective parfaite.

Le protoplasma présente une teinte gris orangé, qui met en relief les structures les plus délicates, entre autres les figures achromatiques de la cytodiérèse ; les chromosomes et la membrane des noyaux sont vivement colorés en rouge, les sphères attractives et leurs corps centraux sont colorés moins fortement, mais tranchent nettement sur le reste du protoplasma.

Si l'on désire accentuer davantage le détail des structures protoplasmiques, on peut, *avant* le traitement par le permanganate, colorer pendant dix minutes par une solution alcoolique d'hématoxyline (alcool à 90 p. 100, 100 grammes ; hématoxyline, 5 centigrammes), laver à l'eau, et différencier pendant dix minutes dans une solution de bichromate de potasse à 2 p. 100. Mais avec du matériel préparé au liquide de Flemming ce traitement peut être supprimé sans trop d'inconvénient.

La méthode au permanganate donne aussi de bons résultats pour les pièces qui ont été fixées par un autre réactif que le liquide de Flemming, tel que le sublimé, les liquides de Perenyi et de Kleinenberg, l'alcool, etc.

L'action mordançante du permanganate est tellement énergique que si elle se prolonge un peu trop longtemps avant la coloration par la safranine et surtout par la rubine, il devient à peu près impossible de décolorer convenablement les coupes ; on n'y arrive qu'en les laissant pendant près d'un mois dans l'essence de girofle.

Digitized by Google

171 *bis*. Mordançage par la Formaline. — OHLMACHER (*Medical News*, Feb. 16, 1895) a trouvé que la formaline est un mordant énergique pour les couleurs d'aniline, si énergique qu'employée avec la safranine elle en fait un colorant plasmatique semblable à l'éosine (solution saturée de safranine O de GRÜBLER dans de la formaline a 4 p. 100). On peut employer la formaline soit combinée à la teinture, comme dans cet exemple, soit en traitement séparé précédant la teinture. Il suffit d'un traitement pendant très peu de temps (une minute pour des préparations sur verre à couvrir) par une solution de formaline de 2 à 4 p. 100 pour mordancer des cellules isolées, avant coloration. Pour la combiner à la teinture, il convient en général de faire la solution de la couleur dans de la formaline à 4 p. 100. Ainsi, 1 gramme de bleu de méthylène dissous dans 100 cc. de solution aqueuse de formaline à 4 p. 100. Il suffit d'y colorer pendant une demi-minute, de laver à l'alcool absolu, d'éclaircir au xylol et de monter au baume, pour avoir une coloration nucléaire très précise sans danger d'une décoloration excessive dans l'alcool. On peut employer de la même manière la fuchsine, le violet de gentiane et le violet de méthyle. Ces trois couleurs peuvent être ajoutées à la formaline sous forme de solution concentrée dans l'alcool.

Je pense qu'OHLMACHER entend parler de la formaline *pure*. J'ai trouvé que combinée à l'acide chromique, au chlorure de platine, etc., en guise de liquide fixateur, elle n'a pas cet effet : au contraire, le matériel se colore fort lentement.

171 *ter*. Mordançage au Tannin et Tartre stibié. — RAWITZ (*Sitzb. Ges. Naturf. Freunde Berlin*, 1894, p. 174; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1895, p. 503 ; et *Leitfaden f. histiologische Untersuchungen*, Iena, 1895, p. 76) a pu employer la safranine et la fuchsine comme colorants *plasmatiques* de la manière suivante. Les coupes *de matériel fixé par le mélange de Flemming* ou par un autre mélange chromique sont mises pendant vingt-quatre heures dans une solution *faite à froid*, de tannin à 20 p. 100 dans l'eau, puis lavées et mises pour deux à trois heures dans une solution de tartre stibié à 1 p. 100, ou 2,5 p. 100, maintenue à une température d'environ 37° C., ou bien pour vingt-quatre heures à la température normale, puis lavées soigneusement et colorées pendant vingt-quatre heures dans la safranine, la fuchsine, le violet de méthyle, le violet de gentiane, ou le vert émeraude, puis décolorées selon la manière usuelle dans l'alcool, ou bien décolorées par un traitement de deux à vingt-quatre heures dans une solution de tannin à 2,5 p. 100.

Digitized by Google

Ce procédé produit, d'après Rawitz, une *inversion* de la coloration : au lieu de la coloration nucléaire que donnent normalement les anilines en question employées sans mordant, on aurait une coloration purement plasmatique. D'après Rawitz, les centrosomes et sphères attractives sont démontrées avec une netteté que cet auteur n'a obtenue par aucune autre méthode. Les fuseaux karyokinétiques sont colorés, dit-il, mais pas les chromosomes ; ceux-ci ont, selon lui, une teinte brune qui est à attribuer au tannin ou à l'acide chromique.

Du matériel fixé dans d'autres liquides que ceux que nous avons indiqués ne donnerait pas, d'après Rawitz, la réaction en question, mais donnerait une coloration diffuse.

J'ai essayé ce procédé plusieurs fois, avec la safranine, avec du matériel fixé au mélange de Flemming, et aussi avec du matériel fixé au mélange de Hermann, et en pratiquant la décoloration tantôt dans l'alcool pur, tantôt dans la solution de tannin. Je n'ai jamais vu la moindre trace de l' « inversion » de coloration décrite par Rawitz. J'ai eu au contraire des colorations *nucléaires* très énergiques, très brillantes et très précises. La seule différence essentielle que montrent mes préparations d'avec les préparations ordinaires, c'est que, outre la coloration de la chromatine, il y a une coloration plasmatique dans un autre ton. La chromatine, soit au repos soit en kinèse, est d'un *rouge vif* (excepté dans les couches superficielles, où l'action de l'osmium s'est fait trop sentir ; là, elle est d'un ton plus sombre.) Le cytoplasme est brunâtre, son élément plastinien très bien différencié. Les fuseaux sont colorés en général d'un gris brunâtre, quelquefois d'un rouge assez vif. Les Nebenkerne et les vestiges fusoriaux sont brun foncé, très bien démontrés. Je ne puis m'expliquer la différence entre les résultats de Rawitz et les miens qu'en supposant que cet auteur a travaillé avec une marque de safranine bien différente de la mienne. En tout cas, les résultats sont beaux et le procédé peut être recommandé, surtout aux anatomistes qui ont affaire à un matériel qui retient mal la couleur. Le mordançage est si énergique que la couleur résiste à l'alcool pendant des heures.

172. Autres colorants nucléaires par voie régressive. — Dans les paragraphes précédents ont été décrits les procédés les plus usités. Il en est cependant d'autres qui donnent de bons résultats. Flemming (*Arch. f. mik. Anat.*, XIX, 1881, p. 317 et 742) a expérimenté avec les couleurs suivantes : safranine, rose de Magdala, dahlia, mauvéine, rouge fluorescent, vert solide, ponceau, orange, éosine,

Digitized by Google

fuchsine, brun Bismarck. (La plupart de ces couleurs provenaient de la fabrique de Bindschedler et Busch, à Bâle.)

Il a trouvé que l'*éosine* et le *ponceau* ne doivent pas être employés, parce qu'ils ne donnent pas de coloration nucléaire. L'*orange* colore avec précision, mais trop faiblement. Toutes les autres couleurs donnent de bons résultats. La *mauvéine* et le *rouge fluorescent* colorent souvent quelques noyaux beaucoup plus fortement les uns que les autres dans une même préparation. Le *vert solide* donne une coloration plus faible que la safranine et le rose de Magdala; il exerce une action spécifique sur la charpente nucléaire et les nucléodes. La *fuchsine* donne une coloration plus faible que le *rose de Magdala*, la *safranine*, le *dahlia* et la *mauvéine;* le *brun Bismarck* ne réussit pas bien avec les préparations à l'acide chromique : avec les préparations alcooliques récentes il donne une bonne coloration nucléaire qui manque cependant de précision. Les meilleurs résultats ont été obtenus en général avec la *safranine*, le *rose de Magdala* et le *dahlia* (le violet de gentiane n'était pas connu à cette date).

La **Fuchsine** est le nom de toute une série de sels de rosaniline qui se trouvent dans le commerce sous les marques de **fuchsine**, **rouge d'aniline**, **rubine**, **roséine**, **Magenta**, **Solferino**, **coralline**, etc., et qui diffèrent plus ou moins dans leurs réactions. Graser (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 378) dit avoir obtenu les meilleurs résultats avec cette couleur de la manière suivante. Ou bien on l'emploie comme nous le dirons plus loin pour le *violet de méthyle* (n° 179). Ou bien, on l'emploie d'après la méthode de Baumgarten en coloration double avec le bleu de méthylène, comme nous le dirons au chapitre des *Colorations combinées*.

La **fuchsine carbolique** de Ziehl est une teinture qui est souvent recommandée. Je n'ai pas pu trouver la source originelle de publication et je cite d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 1, 1890, p. 39.

La solution colorante se compose de :

Fuchsine.	1	gramme.
Acide phénique cristallisé.	5	—
Alcool.	10	—
Eau distillée.	100	—

Ou bien on prend une solution d'acide phénique à 5 p. 100 dans l'eau et on la sature de solution alcoolique concentrée de fuchsine. (Le point de saturation se manifeste par la formation d'une pellicule à reflet métallique à la surface du liquide.) On décolore à l'alcool suivi d'essence de girofle.

Digitized by Google

Le **Brun Bismarck** donnerait d'après KEISER (*Bibl. Zool.*, VII, 1 Hlte, 1891 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 363) de bons résultats comme suit. On colore pendant quarante-huit heures à une température de 60° C. dans une solution saturée de la couleur dans de l'alcool à 60 p. 100, bouillant. On décolore dans de l'alcool à 60 p. 100 additionné de 2 p. 100 d'acide chlorhydrique ou 3 p. 100 d'acide acétique. Nous parlons plus loin du brun Bismarck comme colorant progressif.

La **Nigrosine** soluble à l'eau est une des indulines, petit groupe de couleurs classé par EHRLICH dans les couleurs « acides » sulfoniques, par BENEDIKT dans les couleurs « basiques » (apparemment il se trouve dans le commerce les deux sortes de couleurs, des sels basiques, et des acides sulfoniques).

Cette couleur a été recommandée comme réactif colorant des noyaux par ERRERA (*Proc.-Verb. Soc. Belge de Mic.*, 1881, p. 134). Je l'ai essayée en teinture par la méthode régressive et j'ai obtenu de très belles colorations nucléaires. La couleur s'est montrée très résistante à l'alcool, et je pense qu'elle mérite d'être l'objet d'études plus approfondies.

PFITZER (*Deutsch. Botan. Ges.*, I, 1883, p. 44 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 116) dissout la nigrosine dans une solution saturée d'acide picrique dans l'eau. On peut employer ce liquide pour fixer et colorer en même temps. On lave à l'eau ou à l'alcool dilué ; on monte à la glycérine ou au baume. Pfitzer dit que la méthode est utile pour fixer et colorer des organismes sur le porte-objet. MARTINOTTI (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 479) recommande la solution alcoolique de picronigrosine pour l'étude des centres nerveux.

FREEBORN a employé un semblable liquide pour le tissu conjonctif. Pour ces deux derniers procédés voyez aussi dans la Deuxième Partie.

Peuvent être aussi employés en coloration régressive :

Le **Violet de méthyle** (d'après MARTINOTTI et RESEGOTTI au mieux selon leur procédé de décoloration que nous avons donné au n° 167) ;

La **Trapæoline OOO, n° 2 (Orange II, Chrysauréine, Betanaphtolorange)**, etc. ;

La **Rocelline** (**Echtroth, Orseilline n° 3, Rubidine, Rauvarienne**). Ces deux dernières couleurs sont citées d'après GRIESBACH (*Arch. f. mik. Anat.*, XXII, p. 132).

La **Benzoazurine** a été préconisée par MARTIN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1889, p. 193). Colorer pendant une heure ou deux dans une solution aqueuse diluée, et décolorer dans de l'alcool additionné d'acide chlorhydrique (0,5 à 1 p. 100). Ce colorant a été recommandé pour l'étude de la ligne d'ossification par ZSCHOKKE (*op. cit.*, X, 3, 1893, p. 381).

Le **Bleu de Méthylène** s'emploie aussi en coloration régressive. On emploie une solution aqueuse assez forte, et l'on décolore à l'alcool pur. Cette couleur a le défaut d'être très peu résistante à l'alcool. D'après SQUIRE (*Methods*, p. 36) on en augmente sensiblement la résistance en lavant bien à l'eau avant de passer à l'alcool. Voyez aussi n° 162 *bis*.

La **Thionine**, ou **Violet de Lauth**, homologue du bleu de méthylène, a été chaudement recommandée comme colorant de la chromatine par M. HEIDENHAIN. C'est aussi un des colorants spécifiques de la mucine.

Le **Bleu de toluidine** m'a donné en teinture régressive de superbes colorations, extraordinairement énergiques, de la chromatine, mais (jusqu'à présent) malheureusement accompagnées d'une coloration diffuse du

Digitized by Google

cytoplasme. MANN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 489) dit avoir eu de bons résultats en l'employant après l'éosine, ce qui produit une coloration double, l'éosine agissant comme colorant plasmatique.

B. — COLORANTS PROGRESSIFS

173. Introduction. — Nous rappelons que la plupart des couleurs « basiques » donnent une coloration nucléaire plus ou moins précise par voie directe si l'on acidifie les solutions par l'acide acétique (0,5 à 1 p. 100). Nous ne décrirons ici que les procédés qui fournissent des colorations recommandables sous les rapports essentiels de la simplicité des manipulations et la précision et la permanence de la coloration.

174. Le **Vert de méthyle** du commerce est un chlorure double de zinc et de violet pentaméthyle. Il est préparé actuellement par l'action du chlorure (ou du nitrate) de méthyle sur la base du violet de méthyle, c'est-à-dire sur le violet de rosaniline méthylée (BENEDIKT, *Chemistry of Coal-Tar Colours* ; TASSART, *les Matières Colorantes Artificielles*). Le produit commercial est très variable de qualité, souvent impur, et souvent falsifié (BENEDIKT).

Cette couleur paraît être aussi connue sous les noms de *vert de méthylaniline*, *vert lumière*, « *Lichtgrün* » (ces deux derniers sont en réalité les noms d'une tout autre couleur). En 1874, lorsqu'elle fut étudiée pour la première fois, par CALBERLA (*Morphol. Jahrb.*, III, 1877, p. 625), elle portait le nom de *vert en cristaux*. C'est aujourd'hui le plus répandu des verts dits d'*aniline*, et on le trouve communément dans le commerce passant sous le nom d'autres verts plus coûteux, surtout sous celui de *vert d'iode*. Il importe de ne pas le confondre avec ce dernier, ni avec le *vert d'aldéhyde* (*vert d'Eusèbe*), ou les rosanilines phénylées, le *vert de Paris* et le *vert d'alcali* ou *véridine*. (Voy. le tableau, § 159.)

CALBERLA, qui fut le premier à recommander ce colorant, en 1877, avait été surtout frappé, dit-il, de son action différente sur les tissus de diverse nature; il avait trouvé que « les noyaux du tissu conjonctif sous-cutané et ceux des vaisseaux et des gaines des nerfs s'y coloraient en *rose*, tandis que ceux du chorion se coloraient en *rouge*, et ceux de l'épiderme en diverses nuances de vert bleu et de bleu pur ».

Il est certain que CALBERLA a dit cela. Cette étrange assertion a été répétée par GRIESBACH (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 3, 1886, p. 365), qui en a fait la base d'une importante déduction théorique.

Digitized by Google

Il est impossible de comprendre sur quoi est basée cette assertion extraordinaire, car il est certain que jamais le vert de méthyle n'a coloré aucun élément histologique normal ni en rose ni en rouge. On sait depuis longtemps que le produit commercial colore souvent en violet ou en rose la *matière amyloïde*, et en conséquence on l'a proposé comme réactif de la dégénérescence amyloïde (Heschl, *Wiener med. Wochenschr.*, 2, 1879; puis Curschmann (*Virchow's Arch.*, t. LXIX, 1880, p. 556). Il a été suggéré (Fol, *Lehrb.*, p. 192; Squire, *Methods*, etc., p. 37; Paul Mayer *in litt.*) que cette réaction serait due à ce que la couleur employée contiendrait du *violet de méthyle* comme impureté. Un produit pur *ne donne pas cette réaction* (Squire, *l. c.*). Et il est certain que le produit commercial contient *très souvent* cette impureté, comme on peut facilement le comprendre d'après son mode de fabrication (voy. aussi Benedikt, *l. c.*). Le vert d'iode du reste est dans le même cas. Il paraît donc assez raisonnable de faire les deux suppositions que Calberla avait travaillé avec une couleur qui contenait du violet de méthyle, et qu'il avait eu affaire à des tissus en dégénérescence amyloïde.

Le vert de méthyle fut employé par Balbiani et Henneguy (*Leç. sur la gén. d. Vertébrés*, 1879), puis par Frommann, en 1880, pour des recherches sur des structures cellulaires; et à partir de la recommandation de Strasburger en 1882 (*Arch. f. mik. Anat.*, XXI, p. 476) on peut le considérer comme établi dans la technique en sa vraie qualité de réactif par excellence de la *chromatine dans les tissus frais*.

Strasburger faisait agir sur des tissus frais une solution d'acide acétique à 1 p. 100 contenant en dissolution un peu de vert de méthyle. Ce procédé se fonde sur ce que le vert de méthyle, qui *est par lui-même un agent fixateur* suffisant à fixer et à conserver les éléments dans leur forme, du moins pendant quelques heures, l'est à un plus haut degré quand il est combiné avec l'acide acétique. Il a l'avantage de pouvoir être employé *sur les tissus frais* en combinaison avec d'autres liquides fixateurs ou « indifférents ». Ainsi Carnoy (*Biologie cellulaire*, p. 127, 144, 211) l'emploie tantôt, comme Strasburger, avec l'acide acétique seul, tantôt avec une trace d'acide osmique, tantôt ajouté à la solution de Ripart et Petit. On peut aussi l'employer selon la manière usuelle pour colorer des objets soit fixés sur l'heure et lavés à l'eau, soit fixés et conservés selon les méthodes connues.

Il est bon d'employer, pour les tissus frais, une solution un peu forte additionnée de 1 p. 100 d'acide acétique glacial et 0,1 à

Digitized by Google

1 p. 100 d'acide osmique. La coloration est *instantanée*, et, après lavage, d'une électivité incomparable.

La conservation des objets traités de cette manière offre quelques difficultés, car on ne peut rendre la coloration un peu permanente qu'à force de précautions spéciales. Le mieux est de les montrer dans un milieu aqueux (glycérine, glycérine gélatinée, liqueur de Ripart et Petit), en ayant soin d'*éviter les solutions salines*, d'employer toujours un milieu *légèrement acide*, et d'ajouter sur le bord de la préparation, avant de la fermer, une petite goutte de la solution de vert de méthyle. On peut aussi réussir à conserver ces préparations dans le baume, en employant pour la déshydratation des alcools acidulés par l'acide acétique et chargés d'une quantité suffisante de vert de méthyle, mais ce procédé est assez aléatoire.

M. Heidenhain a trouvé qu'en mordançant par la teinture d'iode la résistance du vert de méthyle à l'alcool (au moins dans la combinaison Ehrlich-Biondi) est sensiblement augmentée. Squire déclare qu'il en est de même d'un simple lavage à l'eau avant de passer à l'alcool.

Henneguy a trouvé que la couleur se conserve très bien dans le liquide de Brun à la glucose.

On peut aussi employer pour les colorations des solutions alcooliques de vert de méthyle. Ces solutions doivent être acidulées par l'acide acétique.

Le manque de sûreté dans la conservation des colorations met des limites à l'emploi du vert de méthyle ; mais, nous le répétons, ce réactif est d'une *importance très grande* comme étant le plus précis et le plus infaillible de tous les colorants de la chromatine *à l'état frais;* pour les préparations temporaires il est certainement sans rival.

Employé sur des tissus frais ou seulement légèrement fixés, le vert de méthyle est le réactif colorant par excellence de la chromatine. Car *au sein du noyau* il ne colore absolument *rien que les chromosomes;* il ne colore ni les nucléoles plasmatiques, ni le caryoplasme, ni le fuseau. Les recherches minutieuses de contrôle de Carnoy ont mis ces faits hors de doute. *En dehors du noyau*, le vert de méthyle peut colorer diverses substances, telles que les enclaves du protoplasma cellulaire, le protoplasma lui-même, certaines membranes et certaines sécrétions, telles que la soie.

175. Vert d'iode (Hofmann's Grün). — Cette substance a été introduite dans la technique histologique par Griesbach (*Zool. Anzeiger*, V, 1882, p. 406). Griesbach pense que le vert d'iode est plus utile que toutes

Digitized by Google

les autres anilines. Les autres histologistes ne se sont pas rangés à son avis, et ce colorant est aujourd'hui entièrement démodé. Du reste le vert d'iode ne se fabrique plus pour l'industrie de la teinture. On peut cependant s'en procurer chez Grübler.

178. Brun Bismarck (Vésuvine, Manchester Brown, la Phénicienne). — Histologiquement, cette couleur présente bien des points de ressemblance avec les deux précédentes. C'est un bon colorant électif des noyaux, et pouvant être employé aussi bien pour des tissus frais que pour ceux qui ont été conservés par les méthodes ordinaires. Les objets traités par l'acide chromique s'y colorent, mais moins bien que d'autres.

Le brun Bismarck ne se dissout pas très facilement dans l'eau. On peut le faire bouillir dans l'eau, et filtrer après un jour ou deux (Weigert, *Arch. f. mik. Anat.*, XV, 1878, p. 258). On peut additionner les solutions aqueuses d'acide acétique et d'acide osmique. Mayzel (*Arch. f. mik. Anat.*, XVIII, 1880, p. 237 et 250) fait dissoudre la couleur directement dans l'acide acétique ; en ce cas, les colorations ne sont pas permanentes.

Paul Mayer emploie aussi une solution saturée de brun Bismarck dans l'alcool à 70 degrés.

Il y a quelquefois avantage à employer une solution dans de la glycérine allongée de 50 à 60 p. 100 d'eau. Les solutions faites à l'eau demandent à être souvent filtrées. On a recommandé d'y ajouter de l'acide phénique (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 908).

C'est un colorant énergique. Des préparations alcooliques ou chromiques peuvent se colorer en quelques instants dans les solutions concentrées, et en quelques minutes dans des solutions étendus. On peut laver à l'eau et monter à la glycérine ; ou bien, passer par les alcools, l'essence de girofle et le baume.

Cette couleur a deux qualités qui contribuent à la rendre extrêmement utile en bien des cas : elle produit rarement des colorations excessives, et, la couleur ne se laissant pas trop facilement extraire par l'alcool, il est très facile de faire des préparations permanentes au baume.

Nous rappelons qu'elle sert pour les « colorations vitales ».

179. Violet de Méthyle (Violet de Paris). — Le procédé suivant a été recommandé par Orth (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1881, p. 137). On colore dans une solution de 1 partie de la couleur dans 300 parties d'acide acétique, on ne lave pas, mais on égoutte et on monte dans une solution de 2 parties d'acétate de potasse dans 1 partie d'eau. Les préparations ne se conserveront guère au delà d'un an.

Digitized by Google

Le procédé suivant paraît devoir être plus utile. GRASER (cité d'après SCHIEFFERDECKER, qui le recommande, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 378) procède comme suit. Des coupes sont colorées pendant douze à vingt-quatre heures dans une solution (il n'est pas dit si c'est dans l'eau ou dans l'alcool) si diluée qu'au bout de ce temps elles en ont absorbé toute la couleur. Décoloration dans l'alcool acidifié suivi d'alcool pur. D'après SCHIEFFERDECKER la différenciation des figures karyokinétiques serait encore plus belle qu'avec la safranine.

La *matière amyloïde* paraît rouge dans les préparations colorées au violet de méthyle. D'après les intéressantes expériences de CAPPARELLI (*Archivio per le Sci. mediche,* III, 21, p. 1), ce serait là un phénomène d'ordre physique (la matière amyloïde aurait la propriété d'arrêter les rayons violets tout en laissant passer les rayons rouges).

Voyez aussi **Violet B**, au chapitre suivant.

Digitized by Google

CHAPITRE XI

BLEU DE MÉTHYLÈNE ET AUTRES COLORANTS PLASMATIQUES

A. — BLEU DE MÉTHYLÈNE

180. Bleu de méthylène. Introduction. — Cette couleur est sous bien des rapports un réactif d'une grande importance. Nous avons déjà dit qu'elle donne de bonnes colorations nucléaires par la méthode régressive. Son importance comme colorant des microbes dans les tissus est connue de tous les pathologistes. On s'en sert comme colorant spécifique des nerfs à myéline du système nerveux central. C'est aussi un réactif spécifique pour certaines cellules à granules (*Plasmazellen*). C'est une des couleurs les mieux tolérées par les cellules vivantes, et partant un des meilleurs colorants « vitaux ». Enfin il sert à fournir des colorations spéciales de tissu nerveux, de ciments intercellulaires, d'espaces lymphatiques et autres objets de ce genre qui sont essentiellement identiques à celles que fournissent les imprégnations à l'or ou à l'argent les mieux réussies ; elles les valent comme résultats, et elles ont l'avantage de se laisser produire avec plus de facilité et de sûreté. C'est ce dernier emploi du bleu de méthylène qui va surtout nous occuper maintenant.

Il est très important de travailler avec une couleur parfaitement pure, et pour cela il est urgent de s'adresser à Grübler ou à l'un des fournisseurs cités au numéro 99. Apathy, dont nous allons décrire les procédés d'imprégnation, n'a trouvé qu'une seule marque qui donne exactement les résultats qu'il décrit ; c'est la marque « *medicinisches Methylenblau, chemisch rein und chlorzinkfrei* » de E. Merck, à Darmstadt.

Digitized by Google

181. Coloration « vitale » d'organismes entiers. — De petits organismes aquatiques facilement perméables peuvent être colorés pendant la vie en additionnant l'eau dans laquelle ils vivent d'un peu de la couleur (assez pour donner à l'eau une teinte bleue perceptible). Après avoir suffisamment attendu, quelques heures ou plusieurs jours, on trouve à l'examen que certains tissus des sujets en l'expérience se sont imbibés plus ou moins de couleur, tandis que d'autres sont demeurés incolores. Si maintenant on remet les animaux dans l'eau colorée et qu'on attende encore, on trouvera, après un laps de temps suffisant, que d'autres groupes de tissus se sont imbibés à leur tour de la couleur. On pourrait bien s'imaginer en conséquence que si l'on attendait encore plus longtemps il arriverait à la fin un moment où tous les tissus des animaux se montreraient chargés de la couleur. Or il n'en est rien. On trouve au contraire qu'un tissu quelconque ne conserve la couleur qui l'a imbibé que pendant fort peu de temps après qu'il a atteint le degré maximum de coloration dont il est susceptible ; une fois ce point atteint, il commence à dégorger la couleur encore plus vite qu'il ne l'a absorbée. L'animal peut même, comme je l'ai observé, après s'être coloré dans la plupart de ses tissus, se décolorer entièrement, toujours dans l'eau chargée de la couleur, et cela sans avoir apparemment souffert en aucune façon. Il s'ensuit évidemment que ces « colorations vitales » ne sauraient prétendre au titre de teintures véritables, mais que ce sont de simples imbibitions des tissus par la couleur. Le lecteur voudra bien revoir ici ce qui a été dit à ce sujet au numéro 97.

Si dans ces conditions on ne peut guère espérer d'obtenir une coloration générale de tous les tissus d'un organisme, on peut cependant obtenir une coloration limitée à certains de ces tissus, et cela de deux manières. On y arrive par la méthode progressive. Si le tissu qu'on désire observer est de ceux qui se colorent de bonne heure, on interrompt l'immersion aussitôt que ce tissu a atteint une coloration suffisante et avant que les autres ne se soient imprégnés au point de gêner l'observation. Et l'on y arrive par la méthode régressive. Si le tissu à observer est de ceux qui se colorent tardivement, on attend pour l'examiner jusqu'à ce que les éléments qui se sont colorés en premier lieu aient dépassé leur point de saturation et se soient déjà dégorgés de leur couleur, pendant que les éléments à observer montrent encore une coloration suffisante. La couleur peut être fixée à l'une ou l'autre de ces étapes par des procédés que nous donnons plus loin (Conservation).

La coloration qu'on obtient par ce procédé d'immersion totale d'un animal vivant est limitée en général à des *granulations* cytoplasmiques, qui se colorent quelquefois très vivement (voyez encore au n° 97). L'ordre dans lequel les tissus se montrent colorés ne peut pas être prévu ; il paraît dépendre des divers degrés de perméabilité des tissus. Les épithéliums, surtout les épithéliums glandulaires, se colorent en général très vite ; puis les cellules lymphoïdes, les muscles, etc. Le tissu nerveux se colore tard ; je n'ai jamais pu le colorer chez un animal parfaitement intègre. On comprendra sans peine qu'un procédé pareil ne saurait être d'une fort grande utilité dans les recherches anatomiques. J'ai surtout tenu à décrire la marche de la soi-disant « coloration vitale » chez les animaux entiers parce qu'elle permet de mieux comprendre la marche à suivre dans les véritables imprégnations ou teintures.

Digitized by Google

La proportion de couleur à ajouter à l'eau pour ces expériences varie naturellement selon les objets. On pourra souvent se laisser guider par la teinte; un bleu assez sensible ne nuira guère, même à des organismes délicats. ZOJA (*Rendic. R. Ist. Lombardo*, XXV, 1892; *Zeit.f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 208) a trouvé qu'une proportion de 1 p. 20000 ou 10000 d'eau est celle qu'il faut pour *Hydra*. Je pense que le plus souvent 1 p. 100000 sera bien assez.

182. Coloration « vitale » de tissus nerveux. — Le principe de ces colorations est dû à EHRLICH (*Abh. k. Akad. Wiss.* Berlin, 25 Feb. 1885; *Nature*, 1885, p. 547). — En injectant des animaux vivants avec des solutions de bleu de méthylène, Ehrlich avait obtenu des colorations de cylindres de l'axe de nerfs périphériques; ces éléments appartenaient toujours à des nerfs sensitifs, les nerfs moteurs ne contenant aucun élément qui montrât cette réaction. (On a trouvé depuis (ARNSTEIN) que les nerfs moteurs se colorent bien aussi, mais plus tardivement). L'état de vitalité des tissus ainsi colorés est un point en litige.

On a cru pendant longtemps que ces colorations ne pouvaient pas se réaliser sur des tissus morts. Cependant DOGIEL (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXV, 1890, p. 305 et seq.) a pu imprégner des nerfs sur des membres de Grenouille jusqu'à trois et même huit jours après que ces membres avaient été séparés de l'animal. Il en a conclu, à la vérité, que cette expérience montre que les nerfs vivaient encore au moment de la coloration. Mais il paraît plus naturel d'en conclure, avec APATHY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 15 et suiv.) que la coloration peut se produire après la mort.

APATHY a fait une série d'expériences destinées à élucider ce point. Voici ses résultats. Il n'est pas nécessaire que le tissu soit vivant, mais il faut qu'il soit frais; aucun élément ne doit en avoir été extrait par action chimique; et son état normal ne doit pas avoir été essentiellement changé par des moyens physiques. Par exemple, le tissu ne doit pas avoir été traité par la glycérine, même diluée, ni par l'alcool; un traitement de peu de durée par la solution physiologique de sel n'est pas très nuisible; le tissu ne doit pas avoir été coagulé par la chaleur.

Il est à peine nécessaire de rappeler que, d'après les conclusions du numéro 97, la coloration une fois établie doit nécessairement intéresser seulement des éléments qui ne vivent plus.

On admet généralement que la *présence de l'oxygène* est nécessaire pour la réalisation de la coloration bleue des éléments nerveux. En conséquence, après avoir traité l'organe par le bleu de méthylène par injection ou immersion, on a coutume de le réséquer et le laisser pen-

Digitized by Google

dant quelque temps exposé à l'air. Et effectivement il se trouve le plus souvent que les tissus ainsi traités ne bleuissent que quelque temps après avoir été ainsi exposés à l'air. APATHY a aussi examiné ce point et trouve (*l. c.*, p. 25) que cette pratique est souvent bonne, mais que la croyance sur laquelle elle repose est erronée. Voici, selon, APATHY, la véritable explication de ce qui se passe.

La coloration des nerfs est une coloration *régressive*. Il a été expliqué plus haut que presque aussitôt qu'un élément a atteint le degré maximum de coloration dont il est susceptible au contact d'une solution de bleu de méthylène, il commence à céder de nouveau sa couleur au liquide qui le baigne. Or plus est considérale le volume de ce liquide et plus sera rapide ce processus de décoloration. Est-il d'une rapidité très grande, la couleur sera vite enlevée des éléments nerveux que seuls on désire avoir colorés, aussi bien que des éléments à coloration plus précoce que l'on désire décolorer pour avoir la coloration spécifique des éléments nerveux seulement. Il est donc avantageux que cette décoloration obligée se fasse dans un *volume de liquide aussi petit que possible*. Il existe bien une autre considération qui justifie la pratique en question. C'est que par l'exposition à l'air les préparations s'assimilent des traces d'*ammoniaque*. Et Apàthy a établi par des expériences que ceci est un facteur important dans la précision de la coloration. Il n'admet pas que l'oxygène y joue un rôle quelconque.

183. Coloration par injection et par immersion. — La pratique ancienne pour la coloration de nerfs était toujours d'introduire la solution colorante par injection dans le système vasculaire ou dans la cavité du corps d'un animal vivant, d'attendre un temps suffisant pour qu'elle puisse agir sur les tissus, puis d'enlever l'organe à étudier pour la préparation ultérieure. On croyait communément que le procédé par injection était essentiel à la production de la coloration. On sait maintenant que cette condition n'est nullement essentielle, et que la réaction s'obtient habituellement tout aussi bien sur des organes simplement enlevés de l'animal et soumis à un bain de la matière colorante de la manière usuelle. Il paraîtrait cependant que pour de certains objets le procédé par injection serait préférable sinon nécessaire. C'est ce qu'a trouvé BÜRGER pour les Némertiens (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, X, 1891, p. 206).

184. Les solutions à employer. — Les *solutions pour injection* se font d'habitude dans de la solution de sel de cuisine dans l'eau à

Digitized by Google

0,75 p. 100 ou moins; les solutions pour coloration par immersion se font ou bien dans la solution saline ou bien dans un liquide « indifférent », ou enfin dans l'eau pure. Les premiers travailleurs employaient des solutions plutôt concentrées de la couleur. Ainsi ARNSTEIN (*Anat. Anz.*, 1887, p. 125) injectait dans la *vena cutanea magna* des Grenouilles 1 cc. de solution saturée, et enlevait l'organe à étudier après une heure. BIEDERMANN (*Sitzb. d. k. Akad. Wiss. Wien; Math. Nat. Classe*, 1888, p. 8) injectait dans le thorax des Écrevisses 0,5 à 1 cc. d'une solution presque saturée dans de la solution de sel à 0,6 p. 100, et laissait les animaux de deux à quatre heures avant de les sacrifier. S. MAYER (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 423) employait une concentration de 1/300 ou 1/400 dans de la solution saline à 0,5 p. 100. Une pareille solution peut être introduite dans l'organisme soit par injection au moyen d'une seringue, soit par auto-injection au moyen du cœur de l'animal. Les Lapins supportent bien cette opération si l'on a soin de pratiquer en même temps la respiration artificielle.

Les solutions de RETZIUS sont d'une concentration semblable. Mais la tendance des travailleurs plus récents est dans la direction de concentrations plus faibles. APATHY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 25, 26, et seq.) trouve qu'il est non seulement inutile, mais même désavantageux de prendre des concentrations supérieures à 1/1000.

Les solutions à employer pour la *coloration par immersion* sont ne général plus faibles que celles que l'on emploie pour l'injection. DOGIEL (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXV, 1890, p. 305; et d'autres travaux plus récents, comme *op. cit.*, XLIV, 1894, p. 15) place des portions de tissu dans quelques gouttes d'humeur aqueuse ou vitreuse, ajoute 2 ou 3 gouttes de solution de la couleur à 1/16e ou 1/15e p. 100 dans de la solution physiologique de sel, et laisse la préparation exposée à l'air. La coloration commence, dans des portions de tissu mince, au bout de cinq à dix minutes, et atteint son maximum dans quinze à vingt minutes. Pour des objets plus épais, — rétine par exemple, — il faut quelquefois plusieurs heures, et en ce cas il faut tenir la préparation humide en l'humectant alternativement de temps à autre avec une goutte du liquide indifférent et une goutte de la teinture. La coloration sera activée par l'emploi (en hiver) d'une étuve chauffée à 30°35° C. ROUGET (*Comptes rend.*, 1893, n° 21, p. 802-4) a trouvé qu'une modification utile du procédé de Dogiel consiste à employer une concentration de 0,05 p. 100 dans de la solution de sel à 0,6 p. 100 (muscles de Batraciens). ALLEN (*Quart. Journ. Mic. Sci.*, 1894, p. 461, 483) prend pour des embryons de Homards une solution de

Digitized by Google

1 p. 1000 (dans de la solution saline) qu'il dilue encore de 15 à 20 volumes d'eau de mer.

185. Méthodes d'Apàthy. — Comme exemple de ces opérations nous ajoutons une description abrégée de la marche recommandée par Apathy (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 15) pour les Hirudinées. On met à nu une portion de la chaîne ganglionnaire. Si on le préfère, on peut la réséquer, mais il vaut mieux ne pas en éloigner le sinus ventral et le tissu pigmenté qui l'entoure avant que la coloration et la fixation n'aient été achevées. Cependant, si l'on désire avoir une coloration de cellules ganglionnaires en même temps que des fibres nerveuses, il faut couper les nerfs latéraux en même temps que les cordons connectifs, dans le voisinage d'un ganglion. La préparation est traitée alors par la solution colorante. Celle-ci se compose, — pour la démonstration surtout des fibres chez *Hirudo* et *Pontobdella* — ou bien d'une solution à 1 p. 1000 dans de la solution saline de 0, 5 à 0,75 p. 100 qu'on laisse agir pendant dix minutes; ou d'une solution à 1/10000, qu'on laisse agir pendant une heure ou une heure et demie ; ou d'une solution à 1/100000 qu'on laisse agir pendant trois heures. (Ces chiffres doivent être doublés pour *Lumbricus*, triplés pour *Astacus* et *Unio*, et quadruplés pour les nerfs à myéline des Vertébrés. Pour la démonstration des cellules ganglionnaires, ils doivent être triplés (les cordons connectifs et les nerfs latéraux ayant été coupés comme nous l'avons dit).

Après coloration, les préparations faites à la solution de 1/1000 sont lavées pendant une heure dans de la solution saline; celles faites à la solution de 1/10000 pendant un quart d'heure ; celles faites à la solution de 1/100000 ne demanderont pas de lavage.

Après lavage, on les traite par l'un des liquides fixateurs et différentiateurs décrits au numéro suivant.

Ceci se fait en les inondant du liquide et en les y laissant pendant au moins une heure *sans les remuer dans le liquide*, et au mieux à l'obscurité. Le traitement ultérieur est également décrit au numéro suivant.

Les liquides fixateurs en question contiennent de l'ammoniaque. Le but de cette addition est d'aider à la différentiation de la couleur en produisant une *différenciation régressive artificielle*. L'ammoniaque agit en décolorant certains éléments plus rapidement que d'autres.

Dans l'objet que nous étudions ce sont, d'après Apathy, les parties protoplasmiques des fibres nerveuses, puis leur « substance interfibrillaire » et « périfibrillaire » qui se décolorent en premier lieu, les « fibrilles primitives » retenant encore fortement la couleur. D'après

Digitized by Google

APATHY, la coloration que l'on obtient ainsi serait une véritable *teinture* de « fibrilles primitives », et non une simple *imprégnation*. Les « fibrilles primitives » se montrent nettement teintées d'un bleu violet, sans aucun précipité granuleux, la substance « interfibrillaire » et « périfibrillaire », et les noyaux, se montrant incolores ou à peu près. Les méthodes usuelles au contraire donnent une réaction inverse, les « fibrilles primitives » demeurant incolores, pendant que la substance « interfibrillaire » et le protoplasme des fibres nerveuses sont *imprégnés* d'un précipité finement granuleux d'un noir verdâtre ou violet, et que les noyaux se montrent en général colorés.

186. Fixation et conservation. — Nous avons déjà expliqué que les colorations obtenues par ces procédés ne se conservent pas au delà de quelques heures, souvent pas au delà de quelques minutes, si l'on ne met en œuvre des précautions spéciales pour les conserver. DOGIEL (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXIII, 4, 1889, p. 440), suivant ARNSTEIN (*Anat. Anz.*, 1887, p. 551), procède comme suit. Après coloration, les préparations sont mises, pour fixer la couleur, dans une solution saturée de picrate d'ammoniaque. On les y laisse une demi-heure ou plus, puis on les lave dans une nouvelle quantité de la solution et on les porte pour l'étude dans de la glycérine diluée, ou bien on les monte définitivement dans de la glycérine saturée de picrate. Plus récemment (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 1, 1891, p. 15) cet auteur a trouvé préférable de prolonger le bain de picrate jusqu'à dix-huit ou vingt-quatre heures, et de monter dans de la glycérine chimiquement pure et libre d'acide, ou bien (*Arch. f. mik. Anat.*, 44, 1894, p. 16) dans de la glycérine allongée d'un volume de la solution de picrate. Ces procédés ont un inconvénient ; c'est que le picrate d'ammoniaque exerce une action macérante très nuisible sur certains tissus. On peut éviter cela en ajoutant au bain de fixation 1 à 2 p. 100 de solution d'acide osmique à 1 p. 100. (Si l'on désire durcir les tissus pour en faire des coupes, il convient de quadrupler la dose de solution osmique.)

S. MAYER (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 422) préférait l'emploi d'un mélange à parties égales de glycérine et de solution saturée de picrate d'ammoniaque, mélange qui servait à la fois à fixer la couleur et à monter les préparations. C'était là en principe aussi la méthode de RETZIUS (*Intern. Monatss. f. Anat. u. Phys.*, VII, 8, 1890). DOGIEL, à la suite d'expériences comparatives, se refuse à admettre que ce procédé soit un perfectionnement.

D'autres travailleurs ont employé une solution saturée d'iode dans

Digitized by Google

l'iodure de potassium (ARNSTEIN), ou bien le picro-carmin (ainsi FEIST, *Arch. f. Anat. u. Entw.*, 1890, p. 116). Le picro-carmin aurait l'avantage de conserver la couleur bleu pur de la teinture, si on ne le laisse pas agir trop longtemps, et si l'on monte ensuite dans la glycérine pure.

LAVDOWSKY a employé l'acide picrique. DOGIEL a étudié ce procédé et l'a rejeté.

APATHY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 30) a trouvé, comme nous l'avons déjà dit que la présence d'ammoniaque libre est un facteur important dans la différenciation de la coloration. Il met ses préparations (après lavage ou non, selon ce qui a été dit au numéro précédent) soit dans une solution saturée de picrate d'ammoniaque *libre d'acide picrique* et additionnée de 5 gouttes d'ammoniaque concentrée pour 100 cc. ; ou bien, ce qui vaut en général mieux, dans une solution à 1 ou 2 p. 100 de carbonate neutre d'ammoniaque, fraîchement préparée et saturée de picrate. Il les laisse dans l'un ou l'autre de ces liquides pendant *au moins une heure*, et au mieux à l'obscurité. Il les met ensuite dans une *petite* quantité de solution saturée de picrate dans de la glycérine à 50 p. 100 et les y laisse jusqu'à ce qu'elles en soient parfaitement pénétrées. Puis il les met dans une solution saturée de picrate dans un mélange de glycérine à 50 p. 100, 2 parties, solution de sucre saturée à froid, 1 partie, et solution pareille de gomme arabique, 1 partie. Après pénétration par ce mélange il les monte définitivement dans le milieu suivant (*l. c.*, p. 37).

Gomme arabique.	50	grammes.
Sucre de canne.	50	—
Eau distillée.	50	—

(Faire dissoudre au bain-marie et ajouter 5 centigrammes de thymol.) Ce sirop durcit très vite et devient aussi dur que le baume, de sorte qu'il n'est pas nécessaire de luter les préparations. On peut aussi se servir du médium de FARRANT (mais en ce cas sans addition d'acide arsénieux). On ne doit en aucun cas ajouter ni picrate d'ammoniaque ni bleu de méthylène au milieu conservateur.

Aucune de ces méthodes n'est parfaitemeut satisfaisante. La plupart n'en conservent pas la coloration dans son ton naturel de bleu, mais la font virer à un gris variant du brunâtre au noir verdâtre. Les préparations ne se conservent guère, même en cet état, au delà de quelques mois ; et l'on est obligé de renoncer au montage au baume. Ces préparations sont particulièrement sensibles à l'action de la lumière. La vive lumière concentrée sur les préparations par le condensateur pendant l'observation leur nuit beaucoup. Et APATHY a

Digitized by Google

remarqué que l'éclairage artificiel est plus nuisible que la lumière du jour, ce qu'il attribue en partie à l'abondance des rayons jaunes, et en partie à la chaleur considérable.

187. Méthodes pour les coupes. — Les procédés décrits jusqu'ici ne donnent pas une fixation de la couleur suffisante pour permettre l'emploi des méthodes usuelles d'inclusion. Feist (*Arch. f. Anat. u. Entw.*, 1890, p. 116; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 321) dit qu'une forte solution de chlorure de platine donne une fixation qui supporte l'inclusion soit dans la celloïdine, soit dans la paraffine. Mais le précipité de couleur fourni par ce réactif est de nature granuleuse, et les préparations ne sont pas très satisfaisantes. Le même auteur a aussi trouvé qu'on peut mettre en œuvre l'inclusion à la gomme de Joliet.

La *Méthode de* Parker (*Zool. Anz.*, 403, 1892, p. 375) est un perfectionnement important. La couleur est fixée (sous forme d'un précipité violet très finement granuleux) par (1) une solution saturée de sublimé dans l'eau. On déshydrate alors les objets dans (2) une solution de 1 gramme de sublimé dans 5 cc. de méthylal (le méthylal pur décolorerait plus ou moins).

On éloigne ensuite le méthylal par un mélange (3) de deux parties de xylol, une partie de méthylal pur, et une partie du mélange numéro 2. Après quelque temps on passe à (4) une quantité considérable de xylol pur. Les préparations doivent y rester jusqu'à ce que tout le méthylal et tout le sublimé en aient été complètement éloignés. Il faut pour cela quatre à cinq jours, car le sublimé est très peu soluble dans le xylol. On peut maintenant monter au baume; ou, si l'on désire faire des coupes, on passe au bain de paraffine et l'on fait l'inclusion de la manière usuelle.

Les coupes doivent être collées sur porte-objet par le collodion de Schällibaum et non par l'albumine de Mayer, car celle-ci les décolore. Les préparations se conservent pendant quelques semaines, mais au bout d'un mois les détails fins auront souffert.

La durée des opérations demandée pour un ganglion de la chaîne ventrale d'une Écrevisse est comme suit : pour 1, dix minutes ; 2, quinze minutes ; 3, dix minutes ; 4, quatre ou cinq jours.

La *Méthode de* Bethe (*Arch. f. mik. Anat.*, XLIV, 4, 1894, p. 585) est comme suit. On fait une solution de

Molybdate d'ammoniaque	1	gramme.
Eau distillée	10	—
Peroxyde d'hydrogène	1	—

Digitized by Google

(En ajoutant le peroxyde, coloration jaune.) On ajoute 1 goutte d'acide chlorhydrique officinal (précipité blanc d'acide molybdique soluble après agitation). Après coloration et rinçage avec de la solution saline, on met les pièces dans la solution molybdique. Elle doit être fraîche, c'est-à-dire n'avoir en tout cas pas plus de huit jours : il est bon avant de s'en servir de la refroidir à 0°. On y laisse les pièces deux à trois heures si elles sont petites, quatre à cinq heures si elles sont grandes (1 centimètre). On lave pendant une demi-heure à deux heures dans de l'eau, on déshydrate à l'alcool (au mieux refroidi à 0°), on éclaircit à l'essence de girofle ou (mieux) au xylol. On fait l'inclusion à la paraffine ou au collodion de la manière habituelle.

La formule ci-dessus est pour les tissus des Vertébrés. Pour les Invertébrés, Bethe conseille 1 gramme de molybdate, 10 cc. d'eau, et 0,5 cc. de peroxyde.

188. Méthodes pour imprégnations (épithéliums, espaces lymphatiques, etc.). — Voici les procédés de Dogiel (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXIII, 4, 1889, p. 440). Des portions convenables de tissus (des membranes minces, si possible) sont mises à l'état frais dans une solution à 4 p. 100 de bleu de méthylène dans de la solution physiologique de sel. Après quelques minutes on les met dans une solution saturée de picrate d'ammoniaque, on les y laisse pendant une demi-heure ou plus, on lave dans une nouvelle quantité de solution de picrate, et on les porte pour l'étude dans de la glycérine diluée.

Si l'on désire démontrer les contours de cellules endothéliales seulement, le bain de teinture doit être abrégé, et ne pas durer plus de dix minutes en général. Si au contraire on désire obtenir en outre l'imprégnation de la substance fondamentale des tissus de manière à avoir une image négative des fins canaux lymphatiques ou autres espaces intercellulaires, il faut colorer pendant quinze à trente minutes, et il sera préférable d'éloigner le revêtement endothélial des tissus avant de les mettre dans le bain de teinture.

Fixation de la couleur, et conservation, comme au numéro 186. Les résultats sont pratiquement identiques, sauf la couleur, à ceux d'une imprégnation négative au nitrate d'argent.

Méthodes de S. Mayer (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 422). Les expériences de Mayer, faites en même temps que celles de Dogiel, mais indépendamment de celles-ci, se rapportent à des objets semblables, et donnent des résultats pareils. Mayer colore pendant

Digitized by Google

dix minutes dans une solution à 1/300 ou 400 de bleu de méthylène dans de la solution de sel à 0,5 p. 100, lave à la solution de sel et monte dans la solution glycérinée de picrate d'ammoniaque citée numéro 186. Il trouve que par ce procédé *on peut produire tous les effets essentiels d'une imprégnation au nitrate d'argent.* Les images sont ou bien positives ou bien négatives. Dans les épithéliums stratifiés et dans les endothéliums (par exemple dans les canaux testiculaires du rat, dans le système vasculaire, dans le muscle lisse), les ciments intercellulaires sont imprégnés. Dans la cornée, la substance fondamentale est imprégnée, et l'on obtient des images négatives des cellules fixes. De même on obtient quelquefois des images négatives des terminaisons nerveuses intra-sarcolemmaires des muscles striés des Grenouilles et des rats. Mais on obtient également quelquefois, comme cela arrive aussi pour le nitrate d'argent, des images positives des éléments de la cornée. Si l'on a procédé par injection de la couleur dans le système vasculaire, ce sont les images positives qui sont les plus abondantes ; tandis que si l'on a coloré par immersion, ce sont les images négatives qui sont les plus fréquentes. Dans les nerfs à myéline, on obtient des images frappantes des figures cruciformes des étranglements de Ranvier.

En somme, presque toutes les images qu'on obtient avec le chlorure d'or ou avec le nitrate d'argent peuvent être obtenues au moyen du bleu de méthylène, et cela avec beaucoup plus *de facilité et de sûreté.*

Pour les autres emplois spéciaux du bleu de méthylène (organes des sens, rétine et terminaisons nerveuses sensitives et motrices, système nerveux central), voir aux chapitres spéciaux de la Deuxième Partie.

B. — Autres colorants plasmatiques

189. Fuchsine acide (Sæurefuchsin, Fuchsin S., Rubin S., Sæurerubin, Magenta acide, Magenta S. ; la dénomination de « Patentsäure Rubin » attribuée à cette couleur par Kultschitzky (*Anat. Anz.*, VIII, 1893, p. 357) est une erreur ; le nom de la couleur dont s'est servi Kultschitzky est « Rubin S., rein pat. », de la *Actien-Gesellschatf. f. Anilinfabrication* à Berlin ; voyez *Zeit. f. wiss. mik.*, X, 2, 1893, et *Anat. Ergeb.*, III, 1893, p. 18-19).

Cette matière colorante est le sel de sodium de la rosaniline disulfoconjuguée, obtenu par le traitement de la rosaniline par l'acide sulfurique concentré. C'est donc une couleur « acide », le principe

Digitized by Google

colorant de ce sel étant représenté par un corps acide. Tandis que dans la fuchsine ordinaire ou fuchsine « basique », qui est le chlorhydrate de la rosaniline considérée comme base, c'est cette base elle-même qui est le principe colorant, ce qui fait que cette couleur est dite « basique ».

Cette couleur est très importante, étant un des meilleurs colorants plasmatiques, sinon tout à fait le meilleur, de toutes les anilines. Sa dissolution dans l'eau (elle est peu soluble dans l'alcool) colore rapidement et énergiquement l'élément plastinien du cytoplasme et du caryoplasme, tout en respectant la chromatine. Cette électivité, qui peut être très précise, ne s'obtient cependant pas toujours sans l'observation de certaines précautions ; un certain degré d'acidité de la solution est, paraît-il, souvent une condition nécessaire. (Voyez sur ce sujet les mémoires de Martin Heidenhain, *Ueber Kern und Protoplasma*, 1892, et *Neue Untersuchungen*, etc., dans *Arch. f. mik. Anat.*, 43, 3, 1894). La coloration résiste fortement au lavage par l'alcool.

La fuchsine acide sert surtout comme colorant plasmatique qu'on fait agir après un colorant nucléaire. Pour cet emploi, une solution à 0,5 p. 100 convient très bien. On la laisse agir seulement quelques minutes, tout en surveillant la marche de la coloration. Elle entre comme ingrédient dans plusieurs mélanges de couleurs très employés, comme le mélange Ehrlich-Biondi-Heidenhain. Voyez pour ces procédés aux Colorations combinées. Elle donne aussi des colorations spécifiques de fibres nerveuses, nous en parlons dans la Deuxième Partie.

190. Rouge Congo (Congoroth ; ne pas confondre avec d'autres Congos, comme le jaune Congo, Congo brillant, etc. Introduit dans la technique par Griesbach, *Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 3, 1886, p. 379). Couleur azoïque, acide. Sa solution aqueuse a une réaction neutre ou alcaline. C'est une des couleurs les mieux tolérées par les cellules vivantes, voyez n° 97. La solution, de même que la coloration qu'elle donne aux tissus, sont naturellement rouges ; mais la couleur dans les deux cas passe à un beau bleu en présence de la moindre trace d'acide (réaction servant à démontrer la présence d'acides libres dans les tissus, voyez les travaux cités par Griesbach, *loc. cit.*).

Je m'en suis servi comme colorant plasmatique *avant* un colorant nucléaire bleu, de la même manière que la fuchsine acide, et j'ai eu de très belles préparations. Malheureusement la couleur ne s'est pas conservée.

Pour les colorations spécifiques de fibres nerveuses que donne cette couleur, voir à la Deuxième Partie.

191. Benzopurpurine, benzopurpurine B, et **deltapurpurine.** — Ces trois couleurs sont toutes de proches parentes du rouge Congo

Digitized by Google

et donnent des colorations rouges assez semblables à celle de cette couleur. Pour la benzopurpurine, voir Griesbach (*l. c.*). Cet auteur la recommande comme colorant de contraste à employer après l'hématoxyline. C'est un colorant très énergique. On ne doit donc prendre qu'une solution extrêmement faible et ne la laisser agir qu'environ une minute. Zschokke (*ib.*, V, 4, 1888, p. 466) recommande beaucoup pour le même emploi la **benzopurpurine B**, à employer de la même manière. La **deltapurpurine**, colorant d'un rouge un peu plus violet, peut s'employer de même. On prend une solution aqueuse modérément concentrée qu'on laisse agir pendant une minute. (Il s'agit naturellement de coupes seulement.) Ces couleurs ont l'avantage de résister fortement à l'alcool.

192. Rouge neutre (Neutralroth ; Ehrlich, *Allg. med. Centralzeitg.*, 1894, 2, p. 20 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 250 ; Galeotti, *ibid.*, p. 193). Couleur récemment découverte, voisine des safranines par sa constitution chimique (Benedikt). On peut se la procurer chez Grübler. N'a été employée jusqu'ici que pour des colorations « vitales ». Des têtards tenus dans une solution à 1 p 10 000 ou 100 000 en absorbent en un ou deux jours une quantité telle que tous leurs tissus paraissent d'un rouge foncé. La coloration est liée à des granulations cytoplasmiques (Ehrlich), ou bien en outre au contenu des cellules mucipares (Galeotti).

193. Les éosines (éosine, tétrabromfluorescéine, éosine G, éosin A, éosin GG f, éosine soluble, éosin B, éosin A extra, rose Bengale, primerose, érythrosine, pyrosine, phloxine, safrosine, rose B à l'eau, et d'autres marques). — Les corps indiqués par ces noms sont tous des phthaléines ; ils ne sont pas identiques par leur constitution chimique et leurs propriétés histologiques, quoique assez semblables.

Ces éosines sont solubles à l'eau ou à l'alcool, selon l'étiquette.

L'éosine est un colorant très énergique et très pénétrant, mais *diffus*. Il est absolument impossible de lui faire fournir une coloration limitée aux noyaux. Sa principale utilité se trouve dans la propriété qu'elle possède de se combiner assez heureusement avec d'autres colorants plus électifs pour fournir des colorations multiples. Comme colorant isolé, cette couleur est entièrement démodée. En conséquence nous nous réserverons d'en traiter au chapitre des *Colorations Combinées*. Voir cependant au besoin Fischer (*Arch. f. mik. Anat.*, XII, 1875, p. 349). — Lavdowsky (*Arch. f. mik. Anat.*, XIII, 1876, p. 359). — Éloui, *Rech. hist. sur le tissu con. de la cornée*, Paris, 1881 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 389) ; et (**Rose Bengale**) Griesbach (*Zool. Anz.*, 1883, p. 172).

Digitized by Google

194. Le Bordeaux R, le ponceau RR, le Biebricher Scharlach, (écarlate de Biebrich, écarlate impériale) **la tropæoline 000 n° 1, le jaune métanil, le jaune solide, jaune acide** (Echtgelb ou Säuregelb) **et l'orange III,** sont toutes des couleurs azoïques et acides, sont solubles à l'eau, résistant suffisamment à l'alcool, et possédant une électivité assez prononcée pour qu'on puisse les utiliser pour des colorations par la voie directe. Ces couleurs paraissent être surtout utiles pour les tissus conjonctifs et glandulaires. Voir, à ce sujet, les expériences détaillées de GRIESBACH, dans *Arch. f. mik. Anat.*, XXII, p. 132, et *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 4, 1887, p. 448.

Tous étant des colorants plus ou moins diffus, ils trouveront surtout leur emploi pour des colorations combinées.

195. L'acide picrique ne s'emploie jamais seul pour les colorations. Mais, colorant rapide et facile à manier, il peut être très utile pour les colorations doubles en combinaison avec une couleur élective pour les noyaux. Ainsi, on peut facilement et utilement teindre en jaune par une solution alcoolique d'acide picrique des préparations colorées par le carmin au borax, le carmin aluné, l'hématoxyline, sans que la première coloration soit altérée par l'action de l'acide. S'agit-il de carmin au borax, il faut savoir que l'acide picrique ne doit pas être dissous dans l'alcool acidulé par l'acide chlorhydrique, vu que, en cette combinaison, il agit comme un décolorant énergique. Il faut d'abord décolorer par l'alcool à l'acide chlorhydrique, puis bien laver, et ensuite colorer dans de l'alcool additionné d'acide picrique.

Il faut noter que l'acide picrique est un colorant plasmatique *diffus*, il colore *tout*. C'est un réactif très commode, mais qui ne donnera jamais de colorations plasmatiques finement différenciées.

Voyez aussi au chapitre des *Colorations Combinées*, n° 229 et suivants.

196. Lichtgrün F. S. (à traduire vraisemblablement par **Vert brillant,** se le procurer chez GRÜBLER). — Colorant plasmatique important, employé d'après la méthode de BENDA, q. v., n° 245.

197. Le vert malachite a été employé par van BENEDEN pour la coloration de la « sphère attractive », dans des préparations glycériques. Je l'ai essayé pour des préparations à monter au baume, mais sans résultat, la couleur ne résistant pas du tout à l'alcool.

Vert d'iode, voyez n° 175, et aussi aux *Colorations Combinées*.

La **Dinitrosoresorcine** (ECHTGRÜN, **Vert solide, Vert d'Alsace, Resorcin Green**), voyez la méthode de PLATNER pour les gaines de myéline.

Vert thiophène, voyez KRAUSE, *Intern. Monatsschr. f. Anat.*, etc., IV, 1887, H. 2.

Digitized by Google

Le **Vert d'aniline** aurait une électivité spécifique pour les cellules mucipares. Nous y reviendrons dans le chapitre des *Colorations Combinées*, et dans la Deuxième Partie.

198. Bleu de quinoléine (**Chinolinblau**; **Cyanine**) (RANVIER; *Traité Technique*, p. 102). — La meilleure manière d'employer cette substance est de la faire dissoudre dans l'alcool à 36° B.; on étend la solution d'une partie d'eau. Il faut se garder d'ajouter l'eau tout de suite, car le bleu ne s'y dissoudrait pas. Ce bleu a une grande puissance colorante, et il faut l'employer en solutions très faibles.

Après coloration, on lave à l'eau et l'on monte dans la glycérine. Au début, on voit les noyaux colorés en violet, les autres éléments des tissus en divers tons de bleu ou bleu gris. Mais, vingt-quatre heures après, on remarque que les noyaux sont décolorés; le protoplasma reste bleu, et dans son intérieur apparaissent des granulations d'un bleu intense. Ces granulations sont formées par des matières grasses du protoplasma décomposées par l'action lente de la glycérine. Cette coloration intense par le bleu de quinoléine appartient en effet spécialement à la graisse. Elle se montre non seulement sur la graisse qui est contenue dans les cellules adipeuses, les cellules du foie, etc., mais encore sur celle qui apparaît au moment de la digestion dans les cellules épithéliales de l'intestin.

Si l'on soumet les préparations colorées à l'action de la potasse à 40 p. 100, l'élection de la matière colorante est immédiate.

La solution aqueuse de quinoléine sert à colorer les Infusoires, soit morts, soit vivants. Nous parlons de ces réactions dans le paragraphe consacré à la méthode de CERTES, au chapitre des *Protozoaires*.

199. Violet B (S. MAYER; *Sitzb. d. k. Akad. d. Wiss.*, III Abth., 1882, Feb.). — Ce violet est un violet de méthyle, préparé par Bindschedler et Busch à Bâle, et par l'Actien-fabrik für Anilinfarben à Berlin (Hallesches Thor). — Mayer fait une solution avec 1 gramme de violet et 300 grammes de solution de chlorure de sodium à 0,5 p. 100. Il emploie des tissus absolument frais, n'ayant été traités par aucun réactif. Ils se colorent en quelques secondes. La coloration est élective pour tous les éléments constitutifs du système vasculaire, à tel point que des préparations d'objets favorables (membranes séreuses) présentent l'apparence de pièces injectées et sont même supérieures à celles-ci sous bien des rapports pour des études angiologiques. Il est très difficile de conserver les préparations; l'acétate de potasse donne les résultats les moins mauvais.

200. Bleu d'aniline. — C'est le bleu de rosaniline, dont les diverses nuances (mélanges des divers produits de fabrication plus ou moins purs) sont connues sous les marques **Bleu alcool**, **Bleu gentiane 6B**, **Spirit-blue 0**, **Bleu opal**, **Bleu de nuit**, **Bleu lumière**, **Bleu de Parme** (BENEDIKT), **Bleu de Lyon** (GIERKE). Couleurs basiques. Ce sont en somme des colorants diffus. Le bleu de Parme (FREY) et le bleu d'aniline (HEIDENHAIN) ont été employés dans le temps pour donner des colorations généralisées, et le bleu lumière a été employé comme colorant plasmatique. Le **Bleu de Lyon** passe pour réserver les noyaux.

D'après MERCIER (*Les coupes du système nerveux*, p. 180), cette couleur

Digitized by Google

serait le chlorure de triphénylrosaniline, et ne se fabriquerait plus, ayant été remplacé dans l'industrie par le bleu de toluidine, ou bleu de Parme.

201. Bleu de méthyle. — Sous ce titre sont compris des dérivés phénylés trisulfoconjugués de rosaniline, couleurs en conséquence acides. Elles portent les marques : **bleu de méthyle, bleu coton, Wasserblau (water-blue, méthyl water-blue), bleu de Chine, China-blau, China blue), bleu soluble,** etc.

Parmi ces marques le **Wasserblau** paraît posséder des propriétés assez importantes. D'après MITROPHANOW, qui l'a introduite dans la technique (*Ob organach schestago schustwa uamfibij*, WARSCHAWA, 1888; cité d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 513), cette couleur aurait les propriétés suivantes. — La solution concentrée dans l'eau donne de très bons résultats en coloration double avec la safranine. La couleur est fort peu extraite par l'alcool. Le cytoplasme est coloré d'une façon énergique et élective. MANN (*ibid.*, XI, 4, 1094, p. 490) l'a employée en combinaison avec l'éosine pour la coloration de cellules ganglionnaires. Pour les détails un peu compliqués du procédé, voyez le travail cité.

Le **Bleu de Chine** a été employé par GALLI pour des recherches sur la structure des gaines de myéline, voyez à la Deuxième Partie.

202. Les **Indulines.** — Couleurs basiques, étant des dérivés de la base violaniline. Elles comprennent les marques **Induline, Nigrosine, Indigène, Bleu de Coupier, Bleu noir, Fast blue, Blackley blue, Bengaline, Guernsey blue, Indigo artificiel, Indigo Substitute.**

L'induline est une marque bleuâtre, la nigrosine une marque plus noire (BEHRENS).

D'après CALBERLA (*Morph. Jahrb.*, III, 1877, p. 627), l'*induline* peut se dissoudre dans l'eau chaude ou dans l'alcool dilué. Pour colorer, on étend la solution aqueuse concentrée de six volumes d'eau. Les coupes s'y colorent en cinq à vingt minutes ; on les traite par l'eau suivie de glycérine, ou par l'alcool suivi d'essence de girofle.

Cette teinture, de même que la quinoléine, a la particularité de ne jamais colorer les noyaux ; les autres éléments des tissus se colorent en un beau bleu.

La **Nigrosine** a été considérée plus haut, n° 172. Nous aurons encore à en parler au chapitre des *Colorations Combinées.*

203. La couleur dite « **Aniline Blue-Black** » a été préconisée par BEVAN LEWIS et d'autres pour des colorations du système nerveux central. Malheureusement ces auteurs n'ayant pas précisé de quelle couleur il s'agit nous ne pouvons dire si c'est le **Blue-Black** de la série des couleurs azoïques, couleur très voisine du noir naphtol, ou si c'est le noir d'aniline de Lightfoot, connu aussi sous les noms de noir de Colin, nigraniline (Gierke). Pour l'emploi, voyez *Centres nerveux.*

Digitized by Google

204. Le **Bleu carmin** (breveté Meister, Lucius et Brünig, à Höchst a. M.) serait aussi si j'ai bien compris une couleur azoïque. JANSSENS (*La Cellule*, IX, I, 1893, p. 9) a démontré qu'il a une électivité spéciale pour les parties du protoplasma qui subissent la différenciation cuticulaire. Janssens l'emploie le plus souvent en solution alcoolique additionnée de 2 à 3 gouttes d'un acide (*e. g.*, HCl) par 100 cc. On peut monter au baume.

204 *bis*. La **francéine** (LÉON, *Zool. Anz.*, 1895, p. 160). — D'après ce qu'en dit Léon, ce nouveau corps colorant serait parfaitement superflu.

Digitized by Google

CHAPITRE XII

DES IMPRÉGNATIONS

205. Les imprégnations sont des colorations produites, non comme dans les teintures par l'assimilation par les tissus d'une matière colorante et elle-même colorée, qui préexiste telle quelle dans le liquide colorant, mais bien par la formation au sein des éléments des tissus de dépôts d'un métal ou autre corps à l'état de division très fine, dépôts formés sur place par les énergies chimiques des tissus aidées par l'action d'agents réducteurs, qui ensemble réussissent à séparer ces corps de la combinaison soluble — généralement un sel — sous forme de laquelle ils ont été apportés au sein des tissus.

Ces dépôts sont, pour la plupart, des métaux réduits de leurs sels solubles ; nous aurons à étudier : l'**or**, l'**argent**, l'**osmium**, le **palladium**, le **fer**, et quelques autres corps moins importants. Nous signalons de suite l'**argent** et l'**or** comme étant de beaucoup les plus importants de ces corps. Les imprégnations à l'argent donnent des colorations d'une électivité remarquable, car elles n'exercent en général leur effet que sur les substances *intercellulaires*, les cellules étant totalement réservées ; c'est le contre-pied absolu des teintures. L'or montre une électivité très prononcée pour les éléments nerveux, et devient par cela d'une importance capitale. Mais les autres agents d'imprégnation donnent plutôt des colorations plus ou moins généralisées, de sorte qu'au point de vue de leurs effets ils se rapprochent plutôt des teintures que de l'argent et de l'or.

206. Imprégnations négatives et positives. — On obtient, selon la manière dont on fait agir l'agent d'imprégnation, deux sortes de colorations. Ce sont : les *imprégnations négatives*, dans lesquelles

Digitized by Google

les substances intercellulaires seules sont colorées, les cellules étant ménagées en clair ou incolores; et les *imprégnations positives*, dans lesquelles les espaces intercellulaires se montrent incolores, et les cellules sont teintées par un précipité granuleux. L'imprégnation négative est celle qu'on cherche à réaliser en général, dans le but de démontrer des contours de cellules, de limiter des espaces intercellulaires, de faire ressortir des espaces lacunaires, de fins canaux lymphatiques, etc. L'imprégnation négative est *primaire*, c'est-à-dire qu'elle a lieu par la réduction immédiate de l'argent dans les espaces intercellulaires qu'il colore; l'imprégnation positive est *secondaire*, car elle a lieu à la suite de la dissolution dans les liquides des tissus du dépôt métallique qui forme l'imprégnation négative, et de l'imbibition conséquente des cellules par la nouvelle solution de sel métallique ainsi formée. Les imprégnations secondaires se forment quand la réduction du métal, lors de l'imprégnation primaire, n'est pas suffisamment énergique. (His, *Schweizer Zeitsch. f. Heilk.* II, Hft I, p. 1; Gierke, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 393; Ranvier, *Traité technique*, p. 107.)

207. Nature du dépôt métallique. — Il règne encore une assez grande obscurité sur la nature du dépôt brun ou noir qui se forme dans les espaces intercellulaires lors de l'imprégnation primaire. V. Recklinghausen pensait, pour le cas du nitrate d'argent, que le sel argentique formait avec un ciment intercellulaire hypothétique (*Kittsubstanz*) un composé qui noircit par l'action de la lumière. D'autres auteurs se sont refusés à croire au ciment intercellulaire, et pensent, les uns, que ce sont les membranes cellulaires qui se colorent, les autres, que le nitrate entre en combinaison avec les liquides albumineux et salins qui baignent les cellules, et se précipite dans de simples rigoles intercellulaires. Schwalbe (*Arch. f. mik. Anat.*, VI, 1870, p. 5) pense qu'il y a lieu de distinguer deux processus : les lignes *noires* résultant de l'action, pendant un temps très court, de solutions très faibles de nitrate d'argent, seraient dues à un précipité veritable formé par réduction du métal dans le liquide intercellulaire; tandis que les lignes *brunes* qu'on obtient en exposant les tissus, pendant un temps plus considérable, à l'action de solutions plus concentrées résulteraient de la formation d'une combinaison de l'argent et du ciment intercellulaire, combinaison qui brunit à la lumière. (Voyez, pour tout l'historique des imprégnations, Gierke : *Fœrberei zu mikroskopischen Zwecken*.) Selon Joseph (*Sitzb. d. k. preuss. Akad. d. wiss. Berlin*, 1888; cité d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, I, 1894, p. 42 et seq.) le précipité ne saurait en aucun cas être de l'argent métallique (car il se dissout dans l'hyposulfite de soude), mais il pourrait être un albumino-nitrate, ou un oxyde d'argent.

208. Conservation des solutions métalliques. — On a coutume de conserver soigneusement à l'abri de la lumière les solutions

Digitized by Google

de sels métalliques employées pour les imprégnations. Cette pratique repose sur la croyance que l'action de la lumière suffit pour réduire les sels dissous et précipiter les solutions. Nous avons déjà expliqué que quant à l'acide osmique en tout cas (n° 35) cette croyance est erronée, et que la réduction en ce cas provient non de la lumière, mais de la poussière. Il y a des motifs pour croire qu'il en est ainsi des solutions de la plupart des sels des métaux lourds. Mon savant ami le Dr Lindsay Johnson, autorisé au double titre d'histologiste et de photographe, a fait de nombreuses expériences à ce sujet. Il me dit : « On peut énoncer comme règle, sans exception, que les solutions des chlorures et des nitrates de tous les métaux lourds se conservent indéfiniment dans des flacons de verre blanc bouchés à l'émeri et exposés à la lumière directe du soleil. Pour ce qui regarde les sels d'osmium, d'uranium, d'or et d'argent, leurs solutions *bénéficient* par l'insolation, laquelle *les mûrit*. C'est là du reste un fait bien connu des photographes. » Surtout pour le chlorure d'or serait-il très important, selon L. Johnson, de n'employer que des solutions bien mûries par insolation.

208 *bis*. **État des tissus.** — Contrairement à ce qui a lieu dans les teintures, les tissus *frais*, c'est-à-dire vivants ou du moins n'ayant été traités par *aucun réactif*, sont ceux qui se laissent imprégner par les métaux avec le plus de facilité et le plus de précision. La plupart des imprégnations *ne peuvent réussir* qu'avec des tissus parfaitement frais dans le sens que nous avons dit.

A. Argent

209. Méthode générale de Ranvier au nitrate d'argent. — Nous empruntons au *Traité technique* de Ranvier (p. 105) les généralités suivantes sur l'emploi du nitrate d'argent.

Le nitrate d'argent peut être employé en solution ou à l'état solide. Ce dernier procédé, qui est le moins usité, est cependant d'une application simple, et fournit de bonnes préparations. On s'en sert avec avantage pour la cornée et le tissu fibreux ; il ne convient pas pour les épithéliums.

Pour la cornée par exemple, voici comment on procède : l'œil étant enlevé, un morceau de nitrate d'argent est passé rapidement sur la surface antérieure de la membrane restée en place. La cornée est détachée et placée dans l'eau distillée ; l'épithélium est chassé avec le pinceau. Le nitrate d'argent, dissous par le liquide qui baigne la

Digitized by Google

cornée, a traversé la couche épithéliale et est venu se réduire sur le tissu fibreux, qu'il colore après l'action de la lumière. Les cellules, au contraire, sont ménagées par l'argent et restent incolores.

Le nitrate d'argent est plus fréquemment employé *en solution*. On fait généralement usage de la solution à 1 centième, à laquelle cependant on ajoute 2, 3 ou 4 parties d'eau, selon les cas. Pour se servir de ces solutions, il y a plusieurs méthodes; il faut les suivre exactement et employer toutes les précautions indiquées, si l'on veut éviter les erreurs.

Ainsi pour une membrane telle que l'épiploon, il faut la tendre, comme la peau d'un tambour, sur un baquet de porcelaine (ou, ce qui est mieux, sur les « anneaux histologiques » des Hoggan[1]), et l'arroser avec une pipette remplie d'eau distillée pour la nettoyer des albuminates et des globules blancs qui peuvent être à sa surface ; puis on l'arrose avec une solution de nitrate d'argent. Pour obtenir des imprégnations vives, il est nécessaire que cette opération se fasse au soleil ou du moins *à une lumière éclatante*. Dès que le tissu blanchit et qu'il commence à passer au gris noirâtre, la membrane est détachée et portée dans l'eau distillée ; après avoir été lavée, elle est placée immédiatement sur la lame de verre et peut être examinée ou montée en préparation définitive selon les méthodes connues.

Si on la laissait séjourner dans l'eau distillée, les cellules se détacheraient et on ne les verrait plus.

Si la membrane n'était pas bien tendue, l'argent se déposerait non seulement dans les espaces intercellulaires, mais partout où il y aurait le plus léger pli, et l'on ne pourrait plus se rendre compte de la forme des cellules.

Enfin, si la membrane n'était pas arrosée avec de l'eau distillée avant de l'imprégner, partout où il y aurait eu un fragment d'albuminate, il se formerait un dépôt d'argent, et l'on croirait voir quelque disposition normale du tissu. C'est ainsi bien souvent que des stomates ont été décrits, tandis que ce n'étaient que des impuretés de la préparation.

[1] **Les anneaux ou tambours histologiques** imaginés par les Hoggan sont des anneaux de caoutchouc légèrement coniques qui entrent à frottement l'un dans l'autre et permettent facilement de pincer et maintenir tendue une portion de membrane pendant toutes les manipulations. On trouvera une description de ce petit appareil très utile dans le *Journal de l'Anatomie* de Robin, 1879, p. 54. L'appareil est fourni par Burge and Warren, 42, Kirby street, Hatton Garden, London, E. C., à raison de 10 shillings les douze paires. On en trouvera également, construits d'après les indications d'Eternod (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, I, 1887, p. 39) chez Demaurex, bandagiste, Fusterie, Genève.

Digitized by Google

On peut modifier la marche à suivre pour les imprégnations, à condition d'observer les précautions nécessaires pour éviter les causes d'erreurs que nous avons indiquées. Ainsi, au lieu de tendre un tissu et de l'arroser, on peut l'imprégner par immersion, en ayant soin de l'*agiter* continuellement dans la solution et en faisant bien attention qu'il ne se *forme pas de plis* dans la préparation.

Ces imprégnations ne réussissent qu'avec des *tissus frais*, c'est-à-dire qui n'ont été traités par aucun réactif.

210. Solutions à employer. — Les solutions de nitrate d'argent doivent être d'une certaine concentration, qui peut varier selon les cas, mais qu'il est important de connaître. « Si la solution est trop faible, par exemple à 1 p. 500 ou 1 p. 1000, ou si la lumière n'est pas vive, il se produit une coloration plus ou moins forte de l'ensemble des tissus, et tout autrement répartie que l'imprégnation. Ce sont les noyaux des cellules qui sont le plus colorés, puis le protoplasma, tandis que la substance intercellulaire ne contient que très peu d'argent. » (Ranvier.)

Les solutions employées par Ranvier varient entre 1 p. 300 et 1 p. 500. La concentration de 1 p. 300 sert pour l'épiploon, l'endothélium pulmonaire, le cartilage et les tendons, tandis que la solution à 1 p. 500 s'emploie pour le centre phrénique et pour l'épithélium intestinal. Pour l'imprégnation de l'endothélium des vaisseaux sanguins par voie d'injection, Ranvier prend des solutions de 1 p. 500 ou 1 p. 800.

V. Recklinghausen prenait, pour la cornée, une concentration variant entre 1 p. 400 et 1 p. 500 (*Die Lymphgefæsse*, etc., Berlin, 1862, p. 5).

Robinski (*Arch. de Physiol.*, 1869, p. 451) se sert de solutions variant entre 0,1 et 0,2 p. 100, qu'il laisse agir pendant trente secondes.

Reich (*Sitzber. d. Wien. Acad.*, 1873, III Abth, Aprilheft : Gierke, *Zeit. f. Wiss. Mik.*, I, p. 397) emploie, pour l'étude de l'endothélium des vaisseaux par injection, des solutions de 1 p. 600 à 1 p. 400.

Rouget (*Arch. de Physiol.*, 1873, p. 603) employait des solutions diluées jusqu'à 1 p. 750 ou 1 p. 1000, qu'il faisait agir à plusieurs reprises pendant trois à cinq secondes, en lavant par l'eau après chaque immersion.

Les Hertwig prennent, pour les animaux marins, une solution à 1 p. 100 (*Jen. Zeitsch. f. Nat.*, XVI, p. 313 et 324 : Gierke, *loc. cit.*).

Les Hoggan (*Journ. of Anat. and Physiol.*, XV, 1881, p. 477) prennent, pour les lymphatiques, une concentration de 1 p. 100.

Tourneux et Hermann (*Journal de l'Anatomie*, 1876, p. 200) se sont

Digitized by Google

servis, dans leurs belles recherches sur les épithéliums des Invertébrés, de solutions à 3 millièmes; quelquefois de solutions plus faibles. Ils laissaient les tissus dans les solutions pendant une heure, puis les lavaient avec de l'alcool à 36 degrés B.

Duval (*Précis*, p. 229) recommande, pour l'emploi général, des solutions de 1 centième, de 2 centièmes et quelquefois 3 centièmes.

Hoyer (*Arch. f. Mik. Anat.*, 1876, p. 649) recommande de prendre une solution de nitrate d'argent d'une concentration connue, et d'ajouter de l'ammoniaque jusqu'à ce que le précipité s'y redissolve à peine, puis d'allonger la solution jusqu'à ce qu'elle contienne 0,75 à 0,5 p. 100 de nitrate.

Cette solution sert principalement pour les imprégnations de l'endothélium des vaisseaux par injection, mais elle peut aussi servir pour l'imprégnation des membranes par arrosage. Elle a l'avantage de n'imprégner absolument que l'endothélium ou épithélium; le tissu conjonctif y demeure incolore. Elle donne, d'une manière générale, des localisations plus nettes que les solutions ordinaires.

Dekhuysen (*Anat. Anz.*, IV, 1889, p. 789; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1890, p. 351) a trouvé utile d'appliquer aux animaux terrestres la méthode imaginée par Harmer (N° 213) pour les animaux marins. On lave une portion de mésentère de grenouille dans une solution de nitrate de potasse à 1. 3 p. 100, puis on la met pour 3 à 6 minutes dans une solution de nitrate d'argent à 0.25 p. 100 additionnée de 3 p. 100 d'acide nitrique. On la met ensuite pour quelques minutes dans de l'acide nitrique pur à 3 p. 100, puis on passe par l'alcool à 96 p. 100 à l'essence de girofle, dans laquelle la réduction s'effectue en quelques minutes à la lumière diffuse.

211. La réduction peut s'effectuer dans bien des liquides autres que l'eau distillée.

Recklinghausen lavait ses préparations dans une solution de chlorure de sodium avant de les exposer à la lumière dans l'eau distillée (*Arch. f. path. Anat.*, XIX, p. 451). On se sert encore aujourd'hui très communément de la solution physiologique de sel (0,75 p. 100) pour ces lavages.

Müller (*Arch. f. path. Anat.*, XXXI, p. 110), après avoir imprégné par immersion pendant deux ou trois minutes dans une solution de nitrate d'argent à 1 centième, dans l'obscurité, ajoute à la solution une petite quantité de solution à p. 100 d'iodure d'argent (dissous à l'aide de l'addition d'une faible proportion d'iodure de potassium). Après agitation dans ce mélange, la préparation est lavée à l'eau dis-

Digitized by Google

tillée et exposée à la lumière pendant deux jours dans une solution à 0,1 p. 100 de nitrate d'argent. (Nous citons d'après GIERKE, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 396.)

LEGROS (*Journ. de l'Anatomie*, 1868, p. 275) lave ses préparations dans une solution d'hyposulfite de soude, ce qui a pour effet de les empêcher de noircir par la suite. Selon DUVAL, on doit faire le lavage pendant quelques secondes seulement dans une solution à 2 centièmes, après quoi on lave à l'eau distillée.

ROUGET (*Arch. de Physiol.*, 1873, p. 603) fait la réduction dans le glycérine.

SATTLER (*Arch. f. mik. Anat.*, XXI, p. 672) expose à la lumière pendant quelques minutes dans de l'eau acidulée par l'acide acétique ou formique. THANHOFFER recommande cette méthode. Il emploie une solution d'acide acétique à 2 centièmes (*Das Mikroskop*, 1880).

KRAUSE porte ses préparations, après lavage, dans une solution de permanganate de potasse, qui doit être d'un rouge clair. La réduction s'y fait très rapidement, même dans l'obscurité. On peut aussi mélanger les deux solutions. La méthode ne réussit pas toujours. (GIERKE, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 400.)

OPPITZ lave ses préparations pendant deux à trois minutes dans une solution à 0,25 ou à 0,5 p. 100 de chlorure d'étain. La réduction s'y fait très vite. (GIERKE, *loc. cit.*).

JAKIMOVITCH (*Journ. de l'Anat.*, XXIII, 1888, p. 142) met ses objets (préparations nerveuses) aussitôt qu'ils sont devenus bruns, dans un mélange de 1 partie d'acide formique, 1 partie d'alcool amylique, et 100 parties d'eau. Les objets étant exposés à la lumière dans ce mélange pendant deux ou trois jours prennent d'abord un ton plus clair ensuite de la dissolution d'une partie de l'argent réduit. Il faut donc renouveler le mélange de temps à autre. Lorsque tout l'argent est redissous, les tissus prennent définitivement un ton plus foncé. Il faut pour cela de cinq à sept jours.

212. Autres sels d'argent. — Le nitrate n'est pas le seul sel d'argent utilisable pour les imprégnations.

ALFEROW (*Arch. de Physiol.*, 1874; *Lab. d'Hist. du Collège de France*, 1874, p. 258 ; DUVAL, *Précis*, p. 230) recommande les sels solubles des acides organiques, tels que le picrate, le lactate, l'acétate et le citrate d'argent, comme donnant de meilleurs résultats que le nitrate. Il se sert de solutions à 1/800, auxquelles il ajoute une faible proportion de l'acide du sel, 10 à 15 gouttes de solution concentrée de l'acide pour 800 cc. de la solution du sel. Le but de l'addition de l'acide libre est de décomposer les précipités formés par l'action du sel d'argent sur les chlorures, carbonates et autres

Digitized by Google

combinaisons existant dans les tissus, en respectant l'albuminate, qui est un composé plus résistant.

Nous avons déjà parlé de l'iodure d'argent de MÜLLER au paragraphe précédent.

213. Imprégnation des animaux marins par l'argent. — A cause de la quantité considérable de chlorures qui baignent les tissus des animaux marins, on ne peut pas les traiter directement par le nitrate d'argent.

HERTWIG (*Jen. Zeitsch.*, XIV, 1880, p. 324) recommande de les fixer d'abord par l'acide osmique en solution faible, puis de laver à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus qu'un précipité insignifiant avec la solution de nitrate d'argent, enfin de les traiter pendant six minutes avec une solution de nitrate d'argent à 1 p. 100.

RANSOM a proposé l'emploi, au lieu d'eau distillée, d'une solution d'un sel neutre qui ne se précipite pas par le nitrate d'argent, et qui soit de la même densité que l'eau de mer.

HARMER (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, V, 1884, p. 44-56) a mis à profit ce conseil pour l'étude du *Loxosoma* et de la *Pedicellina*. Ces animaux peuvent vivre pendant une demi-heure dans une solution de 5 p. 100 de nitrate de potasse dans l'eau distillée. Par ce moyen, il est facile de les débarrasser de la majeure partie de leurs chlorures, et il ne reste qu'à les transporter directement dans une solution de nitrate d'argent. Cette méthode donne de bons résultats avec l'épiderme des Méduses, des Hydraires, de la *Sagitta*, et des Appendiculaires. VOSMAER a pu par ce moyen mettre en évidence l'épithélium de la *Chondrosia* et de la *Thenea*, épithélium que SOLLAS n'avait pas pu apercevoir ; et MEYER a obtenu de bons résultats avec des Annélides et des œufs de Téléostéens. Peu d'animaux résistent aussi bien que les *Loxosoma* et *Pedicellina* à l'action du nitrate de potasse, mais ils y meurent au bout de quelques minutes. Cependant leurs tissus y éprouvent peu de changement, et fournissent en général de bonnes imprégnations. HARMER pense que pour ces animaux on pourrait substituer d'autres sels au nitrate de potasse ; il conseille une solution à 4,5 p. 100 de sulfate de soude.

214. Coloration double des tissus imprégnés, par **teinture** ou **imprégnation.** — Des tissus convenablement imprégnés par l'argent peuvent être utilement traités par la suite par l'un ou par l'autre des colorants des noyaux. On peut employer à cet effet le carmin ou l'hématoxyline ou n'importe quelle teinture, à condition d'éviter les solutions contenant de l'ammoniaque libre, qui redissoudrait le dépôt d'argent. Et il faut observer que la coloration des noyaux ne peut avoir lieu que pour les imprégna-

Digitized by Google

tions négatives bien réussies, c'est-à-dire celles qui ont ménagé les noyaux ; les noyaux qui ont été imprégnés par un métal ne se colorant plus dans les teintures.

On peut aussi faire suivre l'imprégnation à l'argent par l'imprégnation à l'or. En ce cas, l'or paraît en général se substituer à l'argent dans les tissus ; les résultats sont très précis, mais ne produisent pas l'effet d'une coloration double.

215. Imprégnation de tissus nerveux durcis. — Les importantes méthodes de Golgi et autres pour les imprégnations au chromate d'argent, etc., seront exposées dans la Deuxième Partie.

B. Or

216. Caractères des Imprégnations par l'Or. — Le chlorure d'or est un réactif qui diffère du nitrate d'argent en ce qu'il ne fournit guère que des imprégnations positives. Il ne produit, à ce que nous croyons, des images négatives que quand on le fait agir sur des tissus ayant déjà reçu l'imprégnation négative par l'argent auquel il se substitue. Pour obtenir ces imprégnations, on imprègne à l'argent, très légèrement, on réduit, on traite les préparations pendant quelques minutes avec une solution de chlorure d'or à 0,5 p. 100, et on fait la réduction dans l'eau distillée acidulée.

L'emploi du chlorure d'or est indispensable dans maintes recherches sur les organes nerveux, sur les tissus conjonctifs et sur la cornée. Il faut reconnaître que pour tous ces objets il est capable de donner des préparations qui ne peuvent pas être surpassées pour la clarté et la beauté. Mais les résultats qu'il donne sont toujours sujets à beaucoup d'incertitude ; la même méthode, ponctuellement suivie, avec le même objet, donne souvent des résultats différents. L'imbibition des tissus, les effets chimiques qui s'ensuivent, la réduction du métal, sont tous autant de processus au sujet desquels il règne une grande obscurité, et qui sont éminemment variables. De sorte que les préparations qui paraissent le mieux réussies ne méritent pas même une confiance absolue, et il est urgent de contrôler par des préparations, faites par d'autres méthodes, les images souvent trop séduisantes et trop belles qu'elles fournissent.

C'est surtout pour le tissu nerveux que le chlorure d'or déploie une électivité remarquable, qui en fait un réactif précieux pour l'étude de la structure et de la distribution des nerfs et de leurs organes terminaux.

Les procédés très nombreux qui sont employés pour l'imprégnation par l'or peuvent se diviser en deux groupes : l'un, s'appliquant à

Digitized by Google

l'étude des *nerfs périphériques* et de leurs *organes terminaux*, est caractérisé par l'emploi de tissus frais ou ayant subi un traitement spécial par des acides organiques ; — et l'autre, s'appliquant à l'étude du système nerveux central, est caractérisé par l'emploi de tissus durcis selon les méthodes usuelles. L'exposition de ce dernier groupe de procédés trouvera sa place indiquée dans la Deuxième Partie. Le détail en grande partie des procédés du premier groupe y trouvera également sa place naturelle : et ici nous ne ferons qu'exposer d'une façon un peu généralisée les principes de l'art d'imprégnation des tissus frais.

217. Solutions à employer. — L'imprégnation se fait en général au moyen de solutions de CHLORURE D'OR SIMPLE, aux titres que nous indiquons dans les paragraphes spéciaux. Selon quelques auteurs, il y aurait utilité à employer, au lieu du chlorure d'or simple, les sels doubles : chlorure d'or et de potassium, de sodium ou de cadmium. L'avantage de ces sels consisterait en ce qu'ils sont plus neutres, que leurs solutions sont plus stables, et que le commerce en fournit plus facilement des échantillons de composition définie. On les emploie aux mêmes doses et de la même manière que le sel simple. Voici une indication se rapportant à cette question que nous avons trouvée dans un auteur des plus compétents à l'égard de la chimie des réactifs histologiques (SQUIRE, *Methods and formulæ*, etc., p. 43) :

« Le chlorure d'or du commerce n'est pas le chlorure pur, $Au\,Cl^3$, mais le chlorure double cristallisé d'or et de sodium, contenant 50 p. 100 d'or métallique. »

« Le chlorure double d'or et de sodium du commerce est le chlorure double sus-dit mêlé à un poids égal de chlorure de sodium, et contient 25 p. 100 d'or métallique. »

Conservation des solutions. — Nous rappelons ce qui a été dit à ce sujet au n° 208. L. JOHNSON écrit en outre qu'il est bon de prendre aussi les précautions suivantes : — Les tissus doivent être bien lavés à l'eau distillée ; la solution, après insolation, doit être soigneusement acidifiée par addition d'un acétate ou formiate neutre, ou d'acide acétique ou formique ; et après imprégnation, les tissus doivent être lavés jusqu'à ce qu'ils ne donnent plus de réaction au papier de tournesol.

218. État des tissus à imprégner — La règle classique est que, surtout pour des recherches sur des terminaisons nerveuses, les tissus doivent être aussi *frais* que possible. Cependant, DRASCH (cité

Digitized by Google

d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 4, 1887, p. 492) trouve qu'on obtient de meilleurs résultats avec des tissus qui ont été gardés, en un endroit frais, pendant douze, vingt-quatre, ou même quarante-huit heures après la mort. Il soupçonne même qu'une principale fonction de l'acide organique des procédés qui s'inspirent de la méthode de Lowit est d'amener artificiellement les tissus à un certain état dans lequel ils se trouvent naturellement à un moment donné des processus *post mortem*, état dans lequel les nerfs auraient acquis une susceptibilité spéciale à s'imprégner de l'or.

219. Méthode de Cohnheim — L'archétype des procédés qui consistent à faire agir une solution de chlorure d'or directement sur des tissus frais se trouve dans la méthode classique de Cohnheim (*Virchow's Archiv.*, XXXVIII, 1866, p. 346-349; *Stricker's Handb.*, p. 1100). Des fragments de tissu frais sont mis pendant quelques minutes, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils deviennent franchement jaunes — dans une solution à 0,5 p. 100 de chlorure d'or, puis ils sont exposés à la lumière dans de l'eau acidulée par l'acide acétique, jusqu'à réduction de l'or, ce qui arrive plus ou moins vite, au plus tard au bout de quelques jours. Cette méthode donne des imprégnations positives des cellules de divers tissus qui sont souvent extrêmement belles, mais d'une électivité peu prononcée, et les résultats sont très variables.

220. Méthode de Löwit. — Le besoin s'étant fait sentir, surtout dans les recherches sur les terminaisons nerveuses, de faciliter la pénétration et la réduction de l'or, Löwit imagina la méthode de traitement par les acides qui est connue sous son nom, et qui est l'archétype des méthodes employées pour l'aurification des terminaisons nerveuses. Elle consiste en des manipulations dont le procédé suivant peut servir de type. Des fragments frais sont traités par l'acide formique (1 volume de l'acide, d'une densité de 1.12, avec 1 vol. d'eau) jusqu'à ce que, en se gonflant, ils soient devenus transparents. Cela arrive en quelques secondes ou en quelques minutes, selon la grosseur des objets, qui doivent être toujours aussi petits que possible. Par ce traitement, la pénétration de l'or est rendue plus facile, et les tissus sont devenus plus propres à le réduire. On les met alors pendant une quinzaine de minutes dans une solution de chlorure d'or à 1 ou 1,5 p. 100, qui doit être tenue à l'obscurité. Puis on les met pendant vingt-quatre heures dans de l'acide formique dilué (1 partie d'acide pour 1 à 3 parties d'eau), puis pendant vingt-quatre heures encore dans de l'acide formique concentré, ces deux traitements se

Digitized by Google

faisant également dans l'obscurité. On fait des coupes, s'il y a lieu, et l'on monte dans le damar ou la glycérine. (*Wien. Sitzber.*, LXXI Bd., III Abth., 1875, p. 1 ; *Arch. f. mik. Anat.*, XII, 1875, p. 366.)

Les préparations ainsi faites doivent, si elles sont bien réussies, montrer les nerfs seuls imprégnés, au sein des tissus demeurés incolores. Mais, malgré toutes les précautions, on ne peut nullement être certain d'obtenir constamment ce résultat.

221. Méthode de Viallanes. — Des modifications ont été apportées de part et d'autre aux détails du procédé de Lœwit. On a diminué la concentration de la solution d'or. Tandis que Lœwit employait une solution à 1 p. 100, concentration qui est encore généralement employée, quelques naturalistes ont recours, ce nous semble avec raison, à des solutions beaucoup plus diluées. Ainsi VIALLANES (*Histologie et dév. des Insectes*, 1883, p. 42) s'est servi, pour des tissus d'insectes, du procédé suivant. Les tissus sont fixés par l'acide osmique à 1 p. 100, qu'on laisse agir jusqu'à ce qu'ils commencent à brunir. Puis ils sont mis pendant dix minutes dans un mélange de 1 partie d'acide formique et 3 parties d'eau. On les met alors pendant vingt-quatre heures dans une solution de chlorure d'or à 1 p. 5000 ou même beaucoup plus étendue, qu'on a soin de tenir à l'obscurité. On réduit à la lumière dans de l'acide formique au quart. Nous voyons dans ce procédé que nous avons employé et qui nous a donné de très bons résultats, une modification du procédé classique qui nous paraît excellente pour certains objets qui ne demandent pas à être spécialement gonflés par un acide pour faciliter la pénétration du sel d'or.

222. Méthodes de Ranvier. — RANVIER (*Quart. Journ. mic. Sc.*, 1880, p. 456) fait l'imprégnation dans un mélange de 4 parties de solution de chlorure d'or à 1 p. 100 et 1 partie d'acide formique, qu'on a fait bouillir ensemble. Il paraît que le chlorure acquiert, par l'ébullition avec l'acide formique, une plus grande tendance à se réduire dans les tissus et une électivité plus marquée vis-à-vis des tissus nerveux. Notons ici, en passant, que, pour l'étude des terminaisons nerveuses, Ranvier a substitué le jus de citron frais à l'acide formique employé par Lövit pour gonfler les tissus ; il est moins nuisible aux terminaisons nerveuses que ne l'est l'acide formique. Nous donnons les détails de ces deux méthodes dans la Deuxième Partie. — NERFS INTRA-ÉPIDERMIQUES et CORNÉE.

223. Méthodes pour faciliter la réduction. — Une autre sorte de modification qui a été apportée aux procédés de Cohnheim et de Löwit consiste dans la mise en œuvre de manipulations propres à faciliter la réduction de l'or et à la rendre aussi complète que possible.

Digitized by Google

Ainsi BASTIAN a modifié le procédé de Cohnheim en employant une solution de chlorure d'or à 1 p. 2000 acidulée par l'HCl (1 goutte par 75 cc.), et en faisant la réduction dans un mélange à parties égales d'acide formique et d'eau, *maintenu au chaud.* Tous ces détails sont de nature à favoriser la réduction.

HÉNOCQUE (*Arch. de l'Anat. et de la Physiol.*, 1870, p. 111) imprègne dans une solution de chlorure d'or à 0,5 p. 100, puis lave à l'eau pendant douze à vingt-quatre heures, et réduit à chaud dans une solution presque saturée d'acide tartrique. (La solution d'acide tartrique doit être contenue dans un flacon bien bouché. La meilleure température pour la réduction est de 40 à 50 degrés. La réduction se fait rapidement, souvent en un quart d'heure.)

HOYER (*Arch. f. mik. Anat.*, IX, 1873, p. 222) ajoute à de l'eau distillée une à deux gouttes par once d'un révélateur photographique au pyrogallol. Ou bien il emploie l'acide tartrique et l'étuve.

NESTEROFFSKY traite les préparations imprégnées par une goutte de sulfhydrate d'ammoniaque, et achève la réduction dans la glycérine (voyez GIERKE. *Færberei zu mik. Zwecken*).

FLECHSIG (*Die Leitungsbahnen im Gehirn*, etc., 1876 ; *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1884, p. 453) emploie pour la réduction une solution de soude caustique à 10 p. 100.

BOEHM préfère réduire dans la solution de PRITCHARD, qui se compose de 1 partie d'alcool amylique, 1 partie d'acide formique et 98 parties d'eau ; il faut pour cela dix-huit heures dans l'obscurité. (Voyez CARRIÈRE, *Arch. f. mik. Anat.*, XXI, 1882, p. 146.)

MANFREDI (*Archivio per le Scienze mediche*, V, n° 15) met les tissus après imprégnation (par une solution d'or à 1 p. 100) dans une solution d'acide oxalique à 0,5 p. 100, et les y chauffe à 36° sur un bain-marie, puis laisse refroidir et monte à la glycérine. (Cela se fait à la lumière, et il est nécessaire d'opérer par un temps clair.)

Manfredi emploie également pour la réduction, qui doit se faire au soleil, une solution d'acide arsénique à 1 p. 100, qu'il renouvelle à mesure qu'elle brunit.

BOCCARDI (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 155) prend de l'acide oxalique de 0.1 à 0.25 ou 0.3 p. 100, ou bien un mélange de 5 cc. d'acide formique, 1 cc. d'acide oxalique à 1 p. 100, et 25 cc. d'eau, et il y réduit à l'obscurité pendant pas plus de deux à quatre heures.

KOLOSSOW (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, I, 1888, p. 52) réduit pendant deux ou trois jours à l'obscurité dans une solution d'acide chromique à 0,01 ou 0,02 p. 100.

GEBERG (*Intern. Monatsschr.*, X, 1893, p. 205) prétend que le traite-

Digitized by Google

ment préalable des tissus frais pendant vingt-quatre heures par l'eau de chaux (méthode d'ARNSTEIN, n° 620) facilite beaucoup la réduction.

BERNHEIM (*Arch. f. Anat. u. Phys.*, *Phys. Abth* 1892, *Supp.*, p. 29; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 484) ajoute à l'acide formique allongé de Löwit un morceau de sulfite de soude (il doit être frais et sentir fortement l'acide sulfureux).

224. Traitement ultérieur des préparations imprégnées par l'or. — Il n'arrive que trop souvent que les préparations noircissent à la suite d'une imprégnation excessive. On peut les décolorer par le cyanure ou le ferrocyanure de potassium. REDDING emploie une solution faible de ferrocyanure; CYBULSKY, une solution de cyanure de potassium à 0,5 p. 100.

On peut empêcher, du moins en une certaine mesure, le noircissement des préparations, en les mettant pendant quelques jours dans l'alcool, qui a la propriété d'arrêter la réduction de l'or (RANVIER).

Les tissus imprégnés peuvent être colorés après coup par les teintures usuelles, mais il est à remarquer qu'on n'obtiendra la coloration des noyaux par le carmin qu'à condition d'employer une imprégnation négative, les éléments qui ont été imprégnés par le métal ne se colorant plus par le carmin. Les anilines peuvent rendre ici des services (safranine, vert de méthyle, vert d'iode).

Les préparations peuvent être montées dans la glycérine acidulée avec 1 p. 100 d'acide formique, ou dans le baume de Canada. Théoriquement, elles devraient être permanentes si la réduction de l'or a été effectuée d'une manière complète; dans la pratique, on constate que leur durée n'excède guère quelques mois.

225. Imprégnation d'animaux marins. — Pour un motif qu'on n'a pas pu expliquer, les tissus des animaux marins ne prennent pas bien l'imprégnation à l'or dans l'état frais. FOL dit que l'on peut réussir mieux avec du matériel alcoolique.

C. ACIDE OSMIQUE

226. Acide osmique et pyrogallol (LEE, *La Cellule*, IV, 1, p. 110; puis, la *1re Éd. de ce traité*, 1887, p. 140). — J'ai appelé l'attention, dans les endroits cités, sur le fait que la réaction, bien connue des chimistes, du pyrogallol sur l'acide osmique se réalise au sein des tissus. J'avais en effet trouvé « que les tissus traités par l'acide osmique prennent instantanément une coloration noir d'encre si on les traite par une solution même faible d'acide pyrogallique ». Ce

Digitized by Google

procédé donne des résultats qui peuvent être occasionnellement utiles. Mais, comme je l'ai expliqué plus tard (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 185) la réaction est en général beaucoup trop énergique et donne des colorations excessives qui manquent d'électivité.

Je n'avais essayé la réaction que sur des tissus traités par l'acide osmique pur. Plus tard, HERMANN (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 4, 1891, p. 570) l'a essayée avec des tissus fixés par son mélange platino-acéto-osmique. Avec cette modification on obtient des résultats incomparablement meilleurs, comme je puis en témoigner. Je ne pense cependant pas que le procédé particulier de HERMANN soit le meilleur possible. HERMANN fixe pendant un à deux jours dans le mélange, lave beaucoup à l'eau et durcit ensuite dans des alcools successivement plus forts ; après quoi, pour obtenir la réaction noire, il met les pièces pour douze à dix-huit heures dans de l'acide pyroligneux brut. (Cet acide doit être brut, brun foncé et malodore (HERMANN, dans *Anat. Ergeb.*, II, 1893, p. 28).

J'ai trouvé que l'on peut employer indifféremment le mélange de HERMAMN ou le mélange de FLEMMING. On peut fixer pendant douze à vingt-quatre heures si cela est indiqué dans l'intérêt de la fixation ; mais dans l'intérêt seul de la coloration une demi-heure suffit et est *même préférable*. Il est inutile ou même nuisible de traiter par l'alcool. Au point de vue de la coloration, on peut employer pour produire la réaction colorée (il n'y a pas de motif pour admettre que ce soit une « production ») soit l'acide pyroligneux de HERMANN, soit une faible solution de pyrogallol. Il me semble que *celui-ci vaut mieux ;* la différentiation est peut-être plus fine ,et la conservation des pièces me paraît meilleure. Je crois en effet avoir bien remarqué que la conservation des pièces traitées par l'acide pyroligneux laisse à désirer. On peut traiter par l'un ou l'autre de ces liquides pendant vingt-quatre heures, mais une seule heure ou moins pour de petites pièces doit suffire. On *peut* employer une solution *alcoolique* de pyrogallol, ce qui peut être utile *dans certains cas*.

On obtient une réaction semblable avec une solution de tanin.

La méthode ainsi modifiée est importante. On obtient une coloration noire qui différencie suffisamment les éléments des noyaux pour qu'on puisse à la rigueur se dispenser de recourir à une coloration séparée de la chromatine, et qui en même temps différencie assez bien les éléments plasmatiques. C'est une des meilleures méthodes que je connaisse pour mettre en évidence les Nebenkern des cellules spermatiques. Elle donne parfois chez des Invertébrés de jolies différentiations du système nerveux. C'est une méthode *très commode*,

Digitized by Google

et, si l'on fait usage de pyrogallol, très sûre (avec l'acide pyroligneux, moins sûre). Mais ce n'est pas une méthode absolument sans défauts, la coloration plasmatique qu'elle donne n'étant pas sans laisser à désirer. En effet, elle colore, souvent assez fortement, l'enchylème protoplasmatique en même temps que le reticulum plastinien, ce qui nuit à la netteté des images. Et il y a des éléments de la cellule pour lesquels elle n'a pas d'affinité bien marquée, le fuseau entre autres, comme je l'ai déjà fait observer (*La Cellule*, XI, 1, 1895, p. 31).

Quoiqu'à la rigueur cette méthode dispense de l'emploi d'une deuxième coloration pour mettre les noyaux mieux en évidence, on peut cependant y recourir. J'ai trouvé fort avantageux de colorer les coupes ensuite par la safranine (colorer très fortement, vingt-quatre heures au moins).

La méthode a été attribuée à von MAHRENTHAL. Les communications de KOLOSSOW (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, I, 1892, p. 38, et IX, 3, 1893, p. 316) me paraissent être à côté de la question.

D'après AZOULAY (*Anat. Anz.*, X, I, 1894, p. 25) on peut par une modification de cette méthode obtenir une coloration spécifique de nerfs à myéline.

227. Osmium et acide oxalique (BROESICKE, *Centralbl. f. d. med. Wiss.*, 1878, n° 46, p. 833 ; nous citons d'après GIERKE dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 408). — On traite des tissus frais pendant une heure avec une solution d'acide osmique à 1 p. 100. On les lave soigneusement et on les met pendant vingt-quatre heures dans une solution de 1 partie d'acide oxalique pour 15 parties d'eau. Par ce procédé, on obtient de bonnes différenciations de tissus ; la plupart des tissus se colorent en un rouge transparent assez beau, chaque tissu en une nuance particulière; les noyaux, étant plus foncés que le reste, sont bien mis en évidence.

Il faut avoir soin d'arrêter l'action de l'acide osmique avant qu'il ait pu noircir les tissus, car, en ce cas, l'acide oxalique n'a plus le pouvoir de les rougir. Cette méthode m'a donné pour certains sujets d'assez bons résultats, mais elle ne vaut pas le procédé au pyrogallol.

d. *Autres méthodes.*

228. Perchlorure de fer (POLAILLON, *Journ. de l'Anat. et Physiol.*, III, 1866, p. 43). — Le perchlorure de fer produit par imprégnation des colorations fort utilisables. La méthode consiste à imbiber les objets par une solution de perchlorure de fer, et à les mettre ensuite dans une solution faible d'acide tannique, gallique ou pyrogallique, jusqu'à ce qu'ils soient suffisamment noircis.

Les HOGGAN (*Journ. Quekett Club*, 1876; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, II, 1879, p. 358) fixent d'abord par le nitrate d'argent à 0,5 p. 100, qu'ils laissent un peu réduire, puis ils déshydratent les tissus par l'alcool et les traitent pendant quelques minutes avec une solution de perchlorure de fer dans l'alcool. Ensuite ils les traitent pendant quelques minutes (s'il s'agit de membranes

Digitized by Google

minces) avec une solution à 2 p. 100 d'acide pyrogallique dans l'alcool. Ce procédé, très facile, est excellent pour les membranes minces.

Bleu de Prusse (LEBER, *Arch. f. Ophtalm.*, XIV, p. 300; RANVIER, *Traité*, p. 108). — **Sulfate de cuivre**. LEBER (*loc. cit.*). — **Chromate de plomb**, LEBER (*loc. cit.*). — **Sulfures** (LANDOIS, *Centralbl. f. d. med. Wiss.*, 1865, n° 55 ; GIERKE, *Zeit. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 497). — **Molybdate d'ammonium** (MERKEL, KRAUSE), voyez GIERKE, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 96.) — **Oxychlorure de ruthénium** (NICOLLE et CANTAZUCÈNE, *Ann. Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 331).

Digitized by Google

CHAPITRE XIII

COLORATIONS COMBINÉES

229. — On peut distinguer deux groupes de colorations combinées :

Dans l'un, on combine des colorants ayant des affinités différentes pour les diverses sortes de tissus qui existent dans la préparation à colorer, sans se préoccuper de l'électivité de ces colorants vis-à-vis des éléments des tissus, c'est-à-dire vis-à-vis des noyaux, du cytoplasma ou de la substance différenciée des éléments. C'est ainsi qu'on a recommandé une combinaison d'acide picrique et de carmin d'indigo, deux colorants qui manquent absolument l'un et l'autre de toute électivité vis-à-vis des noyaux, mais qui, employés en combinaison, montrent une électivité assez marquée vis-à-vis des tissus, le bleu de l'indigo se portant sur les épithéliums, et le jaune de l'acide picrique se localisant de préférence dans le tissu conjonctif.

Dans l'autre groupe de colorations combinées, on ajoute à une coloration élective pour les noyaux d'une préparation, une ou plusieurs autres agissant sur les éléments extra-nucléaires, éléments qu'il est quelquefois fort important de colorer d'une couleur faisant contraste avec celle des noyaux. Comme exemple typique de ce genre de coloration, nous citerons la double coloration par le carmin boracique et le carmin d'indigo ou le bleu d'aniline.

Avant de donner les formules, nous désirons dire un mot de l'emploi, d'une manière générale, de l'**Acide picrique** dans les colorations combinées. Flemming a fait observer avec raison que l'acide picrique peut être employé utilement et très facilement pour obtenir de doubles colorations avec le carmin ou l'hématoxyline. La technique est des plus simples ; elle consiste tout simplement à ajouter de l'acide picrique aux alcools employés pour la déshydratation des objets déjà colorés par le carmin ou l'hématoxyline. On peut employer

Digitized by Google

toutes les teintures ordinaires de carmin ou d'hématoxyline, sans crainte de voir s'altérer la coloration des noyaux, car même la coloration délicate que donne le carmin à l'alun n'est pas altérée par le traitement par l'acide picrique (FLEMMING, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 360). Mais voyez n° 195.

COMBINAISONS AYANT POUR BASE LE CARMIN

230. Picro-carmin. — Nous ne citons cette combinaison que pour rappeler que le picro-carmin est un colorant double, à condition de ne pas pousser les lavages au point où l'acide picrique disparaît des préparations. On peut toujours prévenir cet effet en faisant les lavages avec des liquides chargés d'une quantité suffisante d'acide picrique.

231. Carmin boracique et picro-carmin. — On ajoute un peu de la solution normale de picro-carmin au carmin boracique de Grenacher, au moment de s'en servir. Le mélange précipite en général au bout de quelques heures, mais cela n'empêche pas les colorations de se faire.

232. Carmin et acide picrique. — Voyez les n°s 195 et 229.

Pour le **carmin picro-lithique** de ORTH, voyez *Berlin. klin. Wochensch.* 28, 1883, p. 421. — Pour le carmin aluné à l'acide picrique de LEGAL, voyez n° 109.

233. Carmin et carmin d'indigo. — SEILER (*Am. Quart. Mic. Journ.*, 1879, p. 220 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1879, p. 613) colore dans le carmin boracique de Woodward (n° 117), décolore par l'HCl, éloigne soigneusement l'acide par le lavage et met les préparations pendant six à dix-huit heures dans une teinture composée de deux gouttes de solution saturée de carmin d'indigo dans l'eau et 30 cc. d'alcool à 95 degrés (il faut filtrer cette teinture avant de l'employer).

H. GIBBES emploie le carmin boracique (n° 117).

Il est évident qu'on peut également employer les carmins au borax de Grenacher, et que la formule alcoolique n° 118 peut répondre à presque tous les besoins.

J'ai essayé cette méthode. Elle réussit avec les coupes, mais elle est très capricieuse. Avec les objets entiers il est à peu près impossible de régler la coloration par l'indigo.

234. Mélange de carmin boracique et carmin d'indigo (MERKEL,

Digitized by Google

Unters. a. d. Anat. Anst. Rostock, 1874; *Month. Mic. Journ.*, 1877, p. 242 et 317). — On fait une solution de la manière suivante :

Carmin	2 grammes.
Borax	8 —
Eau	128 centimètres cubes.

(On triture ces ingrédients ensemble dans un mortier, on laisse reposer, on décante, on filtre, et l'on conserve le liquide dans un flacon bouché.)

Et une autre solution de la manière suivante :

Carmin d'indigo	8 grammes.
Borax	8 —
Eau	128 centimètres cubes.

(Il faut les mélanger, décanter, filtrer et conserver le liquide, comme pour la première solution.)

Au moment de s'en servir, on mêle les deux solutions à volumes égaux. On laisse les objets, qui doivent être petits, pendant quinze à vingt minutes dans la teinture. (Max Flesch préfère les laisser plusieurs heures. Voyez *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 350.) On les décolore en les lavant pendant le même temps dans une solution saturée d'acide oxalique dans l'eau. Puis on lave à l'eau et l'on monte dans un des milieux conservateurs, usuels.

L'acide oxalique a la fonction de fixer dans les tissus le carmin d'indigo qui, étant très soluble dans l'eau, serait enlevé au lavage sans cette précaution; malheureusement il arrive souvent que cet acide précipite le carmin ou le fait passer au jaune, de sorte que la réussite est assez aléatoire. Les auteurs (MERKEL, *loc. cit.;* NORRIS et SHAKESPEARE, *Amer. Journ. Med. Sc.*, Jan. 1877; MERKEL, *Month. Mic. Journ.*, 1877, p. 242; MARSH, *Section Cutting*, p. 85; BAYERL, *Arch. f. mik. Anat.*, XXIII 1885, p. 36-7); MACALLUM, *Trans. Canad. Inst.*, 11, 1092, p. 222; *Journ. Roy. Mic. Soc.* 1892, p. 698) sont d'accord pour trouver que les préparations réussies montrent des différenciations d'une grande richesse et très nettes. D'après Bayerl, la coloration est spécifique pour les corpuscules du sang, qui se colorent d'un vert pomme. Bayerl recommande d'éviter l'essence de girofle pour l'éclaircissement des coupes, vu qu'elle oxyde la couleur et l'altère; il emploie la benzine. Mais de toute façon la couleur n'est jamais parfaitement stable. Ce colorant a été préconisé pour les centres nerveux. C'est une méthode beaucoup plus spéciale que générale.

235. Carmin et bleu d'aniline (DUVAL, *Précis*, etc., p. 225). — Après avoir coloré par le carmin, Duval recommande de déshydrater par l'alcool et de colorer pendant quelques minutes dans une teinture composée de 10 gouttes de solution saturée de bleu d'aniline soluble à l'alcool et de 10 grammes d'alcool absolu, puis de pénétrer par l'essence de térébenthine, et de monter au baume de Canada.

Ce procédé peut s'appliquer à toute sorte de préparations, mais il est particulièrement indiqué pour les coupes de centres nerveux.

D'autres auteurs recommandent le bleu de lumière, qui ne colore pas

Digitized by Google

sensiblement les noyaux (BEDOT), et le bleu de Lyon (MAURICE et SCHULGIN), ce dernier étant dissous dans l'alcool à 70° acidulé par l'acide acétique. Il faut que les solutions soient très faibles.

BAUMGARTEN (*Arch. f. mik. Anat.*, XL, 1892, p. 512) colore *les coupes* (faites sur du matériel coloré au carmin boracique) pendant douze heures dans une solution à 0,2 p. 100 de bleu de Lyon dans l'alcool absolu, et lave pour environ la moitié de ce temps avant de monter au baume. Recommandé pour le cartilage et pour les centres nerveux.

236. Autres combinaisons au carmin. — Picro-carmin et hématoxyline (H. GIBBES, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, III, 1880, p. 390). — **Picro-carmin** avec la **roséine** et le **bleu d'aniline**; ou avec le **violet d'aniline** et le **bleu d'aniline**; ou avec le **violet d'aniline** et le **vert d'iode**; ou avec la **roséine** et le **vert d'iode** (H. GIBBES, *loc. cit.*, p. 392). — **Picro-carmin** et **vert d'iode** (STIRLING, *Journ. of Anat. and Physiol.*, 1881, p. 349). — **Picro-carmin** avec **vert d'iode** et **vert malachite** (RICHARDSON, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1881, p. 868). — **Picro-carmin** et **vert de méthyle** (MAX FLESCH, *Zool. Anzeig.*, 1882, p. 554). — **Picro-carmin** et **éosine** (LANG, *Zool. Anzeig.*, II, p. 45; *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, II, p. 1 et suiv.).

COMBINAISONS AYANT POUR BASE L'HÉMATOXYLINE

237. Hématoxyline et acide picrique. — Nous avons déjà parlé de cette combinaison (n° 229).

238. Éosine hématoxylique. — La coloration successive par l'hématoxyline et l'éosine est une pratique très ancienne. Elle donne de bons résultats, mais n'est pas d'un emploi commode, car elle exige des lavages très soignés, l'*éosine précipitant facilement l'hématoxyline*, si l'on ne prend pas des précautions spéciales. Nous donnons d'après FOL (*Lehrb.*, p. 196) la méthode à laquelle s'est arrêté RENAUT après une étude minutieuse de ces teintures.

On prend :

Solution concentrée d'éosine à la potasse dans l'eau.	30	cent. cubes.
Solution saturée d'hématoxyline dans l'alcool (elle doit avoir été gardée quelque temps et avoir déposé).	40	—
Solution saturée d'alun, de potasse dans la glycérine (densité de la glycérine, environ 1,26).....	130	—

On mélange ces solutions et on laisse reposer le mélange cinq à six semaines dans un récipient couvert d'une feuille de papier percée de trous jusqu'à ce que l'alcool soit évaporé, puis on filtre. Pour la coloration, on se sert soit de la solution telle quelle, soit de solutions diluées. La coloration se fait très lentement, et au début la couleur n'est pas fixée dans les tissus, mais se laisse enlever au lavage. Mais après quelques jours ou quelques semaines elle se localise dans les tissus et s'y fixe. On peut alors monter au baume, en ayant soin d'employer pour la déshydra-

Digitized by Google

tation des alcools chargés d'une proportion suffisante d'éosine. Il est plus commode et souvent préférable de monter les pièces dans la teinture elle-même allongée de 1 à 2 volumes de glycérine pure. Après quelque temps, ce liquide d'inclusion devient parfaitement incolore par suite de la localisation de toute la matière colorante dans les tissus. Ces préparations se sont montrées permanentes jusqu'à présent.

D'autres méthodes pour l'emploi de l'éosine hématoxylique ont été indiquées à plusieurs reprises par Renaut, mais nous pensons que, dans la pensée de ce savant, celle-ci doit les remplacer toutes. Voyez, au demeurant, *Comptes rendus Acad. Sc.*, LXXXVIII, 1879, p. 1039 ; et *Arch. de Physiol.*, 1881, p. 640.

Les solutions d'éosine hématoxylique sont remarquables par leur action élective pour les éléments des glandes salivaires et gastriques. Comme exemple de cette action élective, nous mentionnerons le fait que dans les glandes salivaires de l'*Helix pomatia* elle démontre l'existence de cellules glandulaires de deux sortes, les unes se colorant en rose brillant et les autres (cellules mucipares) d'un bleu intense. Ces cellules ne présentent pas de différence entre elles dans les préparations qui ne sont pas colorées.

Everard, Demoor et Massart (*Ann. Inst. Pasteur*, VII, 1893, p. 166) préparent un mélange semblable comme suit. On fait (A) une solution de 1 gr. d'éosine, 25 gr. d'alcool, 75 gr. d'eau et 50 gr. de glycérine. Puis on fait dissoudre à l'aide de la chaleur 20 gr. d'alun dans 200 gr. d'eau, on filtre, et après vingt-quatre heures on ajoute une solution de 1 gramme d'hématoxyline dans 10 grammes d'alcool. On filtre de nouveau après huit jours, et pour faire le bain de teinture on combine la solution avec un volume égal du liquide A.

239. Hématoxyline et éosine. — List (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, p. 148) colore d'abord à l'hématoxyline, puis pendant quelques minutes dans une teinture composée de trois parties d'alcool absolu et une partie de solution aqueuse d'éosine à 0,5 p. 100. Cette méthode donne de belles colorations des noyaux, qui se colorent en violet, le reste de la préparation étant rose.

Voyez aussi Busch (*Verh. d. Berl. Phys. Ges.*, 1877; Gierre, *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 505).

Martinotti (*Gazz. d. Clin. Torino*, 1883, n° 51 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 582).

Stœhr (*Virchow's Archiv.*, XCVII, p. 211; *Zeit. f. wiss. Mik.*, I, p. 583) ; et, plus récemment, Hickson (*Quart. Journ. Med. Sc.*, 1893, p. 129 (colorer des coupes sur porte-objets pendant une heure dans une forte solution d'éosine dans de l'alcool à 90 p. 100, laver à l'alcool, et colorer pendant vingt minutes dans une faible teinture d'hématoxyline).

Nous faisons observer que la coloration double d'hématoxyline et d'éosine est très à recommander pour des objets embryologiques. L'éosine se porte avec énergie sur le vitellus, qu'il différencie ainsi des feuillets embryonnaires, dans lesquels prédomine le bleu de l'hématoxyline.

Digitized by Google

240. Hématoxyline et benzopurpurine ou deltapurpurine. — Combinaison recommandée. Voyez n° 191 [1].

241. Hématoxyline, fuchsine acide et orange. — Cette combinaison, qui paraît assez indiquée, est cependant peu mentionnée par les auteurs. La méthode de CAVAZZANI (*Riforma Med.*, Napoli, 1893, p. 604; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 3, 1894, p. 344) est par trop compliquée.

242. Hématoxyline et vert d'iode (STIRLING, *Journ. of Anat. and Physiol.*, 1881, p. 353). — Colorer légèrement à l'hématoxyline, puis au vert d'iode. (Coupes de la langue; glandes mucipares vertes, glandes séreuses bleues.)

243. Hématoxyline et nitrate de rosaniline (LIST, *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, p. 149). — Colorer d'abord à l'hématoxyline, puis pendant dix minutes dans une solution de nitrate de rosaniline, laver, déshydrater et monter au baume. Recommandé pour les glandes mucipares, les épithéliums et le cartilage.

COMBINAISONS AYANT POUR BASE LA SAFRANINE

(*Coupes seulement.*)

244. Safranine et Kernschwarz. — Je recommande entre toutes cette combinaison, qui pour bon nombre d'objets m'a donné de meilleurs résultats que tout autre procédé. J'ai décrit au numéro 115 le procédé que j'emploie.

245. Safranine et Lichtgrün ou Sæureviolett (BENDA, *Verh. d. Phys. Ges. zu Berlin*, 1891, 4 et 5 ; aussi dans l'*Arch. f. Phys.* de du Bois-Reymond, 1891). — Colorer des coupes pendant vingt-quatre heures dans de la safranine anilinée ; puis colorer pendant environ une demi-minute dans une solution de 5 grammes de Lichtgrün ou Säureviolett (à prendre chez GRÜBLER) dans 200 cc. d'alcool, déshydrater, et passer par l'essence de bergamote et le toluol au baume de Canada. Je reproche à cette méthode, qui m'a donné de très bons résultats, d'exiger l'emploi de coupes exceptionnellement minces. Il faut faire très attention à ne pas prolonger la coloration par le Lichtgrün, qui exerce une action décolorante considérable sur la safranine.

[1] B. N. — *A partir d'ici, les combinaisons citées ne peuvent guère être utilisées que pour la coloration de coupes, et non d'objets entiers.*

Digitized by Google

246. Safranine, gentiane et orange (FLEMMING, *Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 249 et p. 685). — Méthode célèbre. Colorer, au mieux pendant deux ou trois jours ou même semaines (*Anat. Ergeb.*, III, p. 68) dans de la safranine anilinée, rincer à l'eau, décolorer dans de l'alcool acidulé au maximum par 0,1 p. 100 d'acide chlorhydrique jusqu'à ce qu'il ne s'extraie presque plus de couleur. Colorer ensuite pendant une à trois heures dans du violet de gentiane (solution aqueuse simple, ou bien le procédé de GRAM, n° 168), laver à l'eau, et traiter par une solution aqueuse concentrée d'orange, laquelle en vertu de ses propriétés acides extrait plus ou moins du violet de gentiane. Après quelques minutes au maximum, et pendant que les coupes cèdent encore de pâles nuages violets si on les agite, on les met dans l'alcool absolu, on les y laisse jusqu'à ce qu'elles n'y perdent presque plus de couleur, on éclaircit à l'essence de girofle ou de bergamote, et avant que les derniers pâles nuages de couleur aient cessé de se montrer on monte au baume.

L'orange à employer est l'orange G de GRÜBLER (fabrique de Meister, Lucius et Brüning à Höchst, ou de l'Actiengesellschaft für Anilinfabrication à Berlin).

Ce procédé n'est pas censé donner une coloration *triple*, mais une coloration *mixte*. Nous en parlons encore au chapitre des *Méthodes Cytologiques*.

Je n'ai pas assez d'expérience de cette méthode pour avoir qualité de porter un jugement définitif à son égard. Je puis cependant dire qu'elle est d'une exécution très délicate — il suffit du moindre manque de jugement dans les opérations de décoloration pour tout compromettre — et en conséquence les résultats sont plus ou moins aléatoires.

J'ai bien obtenu par ce procédé des résultats qui paraissent être ceux que, d'après la description de FLEMMING, ce procédé doit produire. Ce sont des images fort belles, mais je préfère en général celles de la méthode du Kernschwarz et safranine, qui a en tout cas l'avantage d'être parfaitement sûre.

Voici maintenant une modification du procédé de FLEMMING, préconisée par REINKE (*Arch. f. mik. Anat.*, XLIV, 2, 1894, p. 262). Des coupes (de matériel fixé au liquide de HERMANN) sont mises pour vingt-quatre heures dans une solution concentrée de sulfite de potassium. On rince à l'eau et on colore pendant une ou deux heures dans la safranine. On lave bien à l'eau et l'on colore pendant vingt-quatre heures dans un mélange « neutre » de violet de gentiane et d'orange, qu'on prépare comme suit. On ajoute à une solution aqueuse concen-

Digitized by Google

trée de violet de gentiane *quelques gouttes* de solution aqueuse concentrée d'orange.

La solution se précipite en partie par suite de la formation d'une couleur neutre imparfaitement soluble, mais redevient presque claire si l'on ajoute un excès d'eau.

Une goutte du mélange déposée sur du papier buvard doit faire une tache d'un violet pur ou brun au centre avec un étroit liséré d'orange pâle.

On met les coupes « dans cette solution » sans avoir filtré (je traduis littéralement; il est impossible de comprendre si l'auteur veut dire le mélange concentré ou le mélange étendu d'eau). Après vingt-quatre heures on déshydrate rapidement dans l'alcool absolu, et on éclaircit à l'essence de girofle.

On peut conserver la solution de gentiane neutre en y ajoutant un tiers d'alcool.

Le lecteur aura bien remarqué que les instructions de Reinke ne sont rien moins que précises. Elles suffiront, je pense, le plus souvent pour mener au but. Un essai fait avec le mélange, mais sans mordançage préalable par le sulfite de potassium, m'a donné des résultats sensiblement identiques à ceux du procédé de Flemming. Il me semble qu'avec le procédé de Reinke on doit avoir moins souvent des insuccès qu'avec celui de Flemming.

247. Safranine et hématoxyline (Rabl, *Morph. Jahrb.*, X, 1884, p. 215). — Colorer très légèrement à l'hématoxyline (vingt-quatre heures dans une solution extrêmement allongée d'hématoxyline de Delafield), laver à l'alcool acidifié par l'HCl, colorer fortement à la safranine. Ici la safranine est le colorant nucléaire et l'hématoxyline le colorant plasmatique. Cette méthode m'a donné de forts bons résultats, il y a quelques années ; mais je la considère comme démodée.

Pour la coloration de préparations de *sang*, Foà fait un mélange des deux couleurs. (Voir à la *Deuxième Partie*.)

248. Bleu d'aniline et safranine (Garbini, *Zool. Anzeig.*, 1886, p. 26; et *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 2, 1888, p. 170). — Excessivement compliqué.

249. Nigrosine ou carmin d'indigo et safranine (Kossinski, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 1, 1889, p. 61). — J'ai essayé la combinaison avec la nigrosine et n'ai pas réussi.

COMBINAISONS A LA FUCHSINE ACIDE

(*Coupes seulement.*)

250. Bleu Victoria et fuchsine acide. — J'ai eu de bons résultats avec cette combinaison. Les coupes sont traitées pendant dix

Digitized by Google

minutes par la teinture d'iode ; puis, bleu Victoria, dix-huit heures ; fuchsine acide (Säurefuchsine), solution aqueuse à 0,5 p. 100, dix minutes ; alcool ; essence de girofle ; colophane.

Il ne faut pas employer la fuchsine acide en premier lieu, car le Victoria la décolorerait par substitution.

Je pense que le violet de gentiane donnerait également de bons résultats en cette combinaison.

Le rouge Congo ne donne pas de préparations stables. Voycz numéro 190.

251. Mélange Ehrlich-Biondi (ou Ehrlich-Biondi-Heidenhain) (Pflüger's, *Arch. f. d. ges. Phys.*, XLIII, 1888, Supp., p. 40 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, V. 4, 1888, p. 519). — Ce célèbre mélange a été depuis quelques années très employé en Allemagne et en Angleterre, il a été l'objet d'un véritable engouement. La préparation en est assez délicate ; heureusement on peut se le procurer tout fait chez Grübler (n° 92).

Ce liquide fut imaginé en premier lieu par Ehrlich, puis modifié par R. Heidenhain et Biondi. Nous citons d'après R. Heidenhain.

A 100 cc. de solution saturée d'orange dans l'eau on ajoute, en agitant constamment, 20 cc. de solution saturée de fuchsine acide (Säurefuchsine) dans l'eau, et 50 cc. d'une solution pareille de vert de méthyle.

On allonge le mélange de 60 à 100 volumes d'eau. Le mélange allongé doit virer au rouge d'une manière évidente par addition d'acide acétique. Si l'on en pose une goutte sur du papier buvard, elle doit former une tache d'un vert bleuâtre au centre et orange vers les bords. Si la zone orangée est entourée d'une zone rouge plus large, c'est que le mélange contient trop de fuchsine.

Ces réactions ne suffisent pas pour assurer une bonne solution. Une solution ainsi préparée ne donne pas infailliblement l'électivité voulue de la coloration de la fuchsine acide ; et les préparations ont une tendance à se faner en peu de temps. En acidifiant la solution on obtient une teinture plus élective et donnant des préparations qui ne se fanent pas. Mais il faut user de grandes précautions en acidifiant ; car si l'on ajoute trop d'acide on nuira à l'électivité de la teinture en provoquant une coloration de la substance interfilaire en même temps que l'élément plastinien. Voici, d'après M. Heidenhain (*Ueber Kern u. Protoplasma*, Engelmann, 1892, p. 116), comment il faut procéder :

On prend une quantité voulue de la solution originelle et on l'al-

Digitized by Google

longe d'eau dans la proportion de 6 volumes de la solution pour 400 d'eau distillée. On prend deux verres pareils, on les remplit d'eau distillée et l'on ajoute à chacun quelques gouttes de la solution allongée, de manière à avoir dans chacun un liquide de la même teinte.

Ce liquide doit accuser en même temps un ton rouge provenant de la fuchsine acide, un ton jaune provenant de l'orange, et un ton grisâtre provenant du vert de méthyle. On ajoute maintenant à l'un des verres, goutte à goutte et en agitant continuellement, de l'acide acétique fortement dilué (1 p. 500 d'eau) jusqu'à ce que le liquide vire fortement au rouge cramoisi (le ton jaune primitif disparaissant en même temps et le ton gris devenant moins évident). On met ces deux verres de côté pour servir de témoins. On reprend maintenant la solution allongée qu'on avait préparée en premier lieu, et on l'acidifie avec l'acide acétique dilué, tout en agitant fortement. On en prend de temps à autre quelques gouttes que l'on ajoute à un troisième verre contenant de l'eau distillée ; et l'on procède ainsi jusqu'à ce que dans ce troisième verre on ait réalisé le ton beau rouge cramoisi du verre témoin qui a été acidifié. Aussitôt que ce point a été atteint, le bain de teinture est prêt. Mais si les préparations ne réussissent pas d'une manière tout à fait satisfaisante, on peut ajouter encore de très faibles quantités d'acide.

Ce n'est pas encore tout. Il est si important d'atteindre et de conserver exactement le degré voulu d'acidité de la solution, qu'il faut encore une précaution ou deux (*Arch. f. mik. Anat.*, XLIII, 3, 1894, p. 430).

La teinture ne doit pas être filtrée, car la filtration peut la rendre moins acide. Et si on l'a conservée pendant quelque temps, il faut l'additionner d'un peu d'acide, parce qu'elle aura dissous des traces de verre, qui est un corps alcalin. Heidenhain va jusqu'à conseiller de conserver la solution dans des récipients de gutta-percha.

Il est absolument nécessaire que l'orange soit l'orange G, que la fuchsine acide soit la Rubin S (on sait que « rubine » est synonyme de « fuchsine »), et que le vert de méthyle soit le Methylgrün OO, toutes de la fabrication de la Aktienfabrik für Anilinfabrikation à Berlin (on peut se les procurer chez Grübler).

Nous donnerons dans le numéro suivant deux modifications de ce mélange, qui ont du moins le mérite d'être des simplifications.

Il est bon d'observer que les solutions originelles des trois ingrédients doivent être absolument concentrées, ce qui ne s'obtient qu'après plusieurs jours de solution. Elles ont une tendance à précipiter au mélange. En conséquence Squire (*Methods*, etc., p. 37) recommande

Digitized by Google

de les allonger de la proportion d'eau voulue pour la dilution définitive *avant* de les mélanger.

Pour assurer la permanence de la coloration il est bon (M. HEIDENHAIN) de traiter les coupes pendant deux heures par l'acide acétique dilué à 0, 1 p. 100, de les mettre ensuite pendant un quart d'heure dans de la teinture d'iode, et rincer ensuite à l'alcool, avant de les mettre dans le bain de teinture. Le traitement par l'acide a pour but d'assurer que les préparations aient une réaction acide lorsqu'on les monte au baume. Le traitement par l'iode a pour effet de rendre plus énergique la coloration de la chromatine par le vert de méthyle et de rendre plus élective la coloration des éléments protoplasmiques. (Les instructions de M. HEIDENHAIN ont trait à du matériel fixé par le sublimé. J'ai trouvé que la coloration de matériel fixé par le mélange de FLEMMING est encore plus précise.)

On colore pendant six à dix-huit heures. On rince à l'eau, on déshydrate aussi rapidement que possible dans l'alcool, on éclaircit au xylol, et on monte au baume. On déshydrate *aussi rapidement que possible* pour deux motifs : l'un, c'est que la méthode est censée être une teinture *progressive* ne demandant pas de différenciation après coup ; l'autre, c'est que le vert de méthyle est très peu résistant à l'alcool, et s'en irait à coup sûr à un lavage prolongé.

Les résultats varient beaucoup selon la nature des tissus. On peut dire en somme que la chromatine se colore en bleu à l'état de repos, en vert à l'état kinétique, et que les éléments plasmatiques prennent divers tons de rouge, rarement orange. L'électivité est très précise, ce qui ne veut cependant pas dire que la fuchsine et l'orange colorent infailliblement tous les éléments plasmatiques qu'on voudrait avoir mis en évidence.

Dans les préparations réussies l'effet est de toute beauté. Mais il est incontestable que, malgré les plus grandes précautions, elles ne réussissent pas toujours.

Il est absolument nécessaire de n'employer que des coupes excessivement minces, car il faut que la déshydratation puisse être faite en une trentaine de secondes, sans cela les noyaux perdent infailliblement leur couleur. Et le moindre défaut ou excès d'acidité de la solution peut rendre la coloration par la fuchsine acide diffuse au lieu d'être nettement localisée dans l'élément plastinien. Les préparations ne se conservent que moyennant toutes les précautions que nous avons indiquées. En somme donc je pense qu'il faut admettre que cette méthode a sa raison d'être pour les objets très spéciaux qu'avaient en vue les auteurs qui l'ont imaginée, pour les recherches sur

Digitized by Google

les granulations cytoplasmiques d'Ehrlich, ou pour les recherches sur le réticulum cytoplasmatique de Martin Heidenhain, et d'autres objets semblables. Mais vouloir, comme paraissent le prétendre certains observateurs, en faire une méthode à appliquer à toute sorte d'objets, c'est tomber dans l'exagération, et certainement on en reviendra.

252. Mélange triacide d'Ehrlich. — Suivant l'exemple d'Ehrlich, on appelle Mélange triacide (*Triacidlösung*) un mélange des mêmes trois couleurs que celles du réactif Ehrlich-Biondi du numéro précédent, mais dans des proportions telles que les couleurs « acides » y prédominent. L'expression est impropre au point de vue chimique, car le mélange ne contient que deux couleurs « acides », l'orange et la fuchsine acide, le vert de méthyle étant une couleur fortement « basique ».

La suivante est une formule récente d'Ehrlich pour ce mélange, communiquée à Reinbach (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 259).

Orange G., solution saturée aqueuse. . .	120	grammes.
Fuchsine acide. — . . .	80	—
Vert de méthyle. — . .	100	—
Eau distillée	300	—
Alcool absolu	180	—
Glycérine	50	—

Il faut veiller à ce que les solutions soient absolument concentrées, et il ne faut jamais agiter le mélange, mais en puiser chaque fois ce qu'il faut avec une pipette plongée dans la couche superficielle. Avec ces précautions le mélange se conservera pendant des années.

Voici maintenant, d'après Warburg (cité d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 3, 1894, p. 382) une manière de composer cette solution au moyen du Mélange Ehrlich-Biondi, due à M. Heidenhain : — « 2 cc. de mélange Biondi (1 : 30) + 40 cc. d'eau distillée + 3 cc. de solution de fuchsine acide à 0. 5 p. 100 + 0. 2 cc. d'acide acétique à 1 : 500. »

Ces formules ont évidemment plus de précision que celle du mélange Ehrlich-Biondi du numéro précédent, et en constituent une simplification. Mais elles présentent le même inconvénient que celle-ci, à savoir la difficulté qu'il y a à conserver le vert de méthyle dans les noyaux lors de la déshydratation des préparations. Pour ce motif je pense qu'elles sont, tout autant que le mélange Ehrlich-Biondi, impropres à la coloration des *coupes*, et ne doivent servir que pour la coloration de préparations de sang séché sur porte-objet et autres préparations analogues.

Digitized by Google

On trouvera dans Rawitz, *Leitfaden f. hist. Untersuchungen*, 1895, p. 71, une autre formule donnée sous le titre de Mélange Triacide d'Ehrlich. Cette formule donne le *vert d'éthyle* (*Aethylgrün*) au lieu de *vert de méthyle*. Rawitz ne citant pas de source, je ne puis dire s'il n'y a pas là une faute d'impression pour *vert de méthyle*.

AUTRES COMBINAISONS

(*Coupes seulement.*)

253. Vert de méthyle et éosine (Calberla, *Morph. Jahrb.*, III, 1877, p. 625). — On prend une partie d'éosine et 60 parties de vert de méthyle et l'on fait une solution avec de l'alcool à 30 p. 100 chaud. Des coupes se colorent dans cette solution en cinq à dix minutes ; on les lave rapidement dans des alcools successifs, et l'on monte dans le baume ou dans la glycérine.

254. List (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, p. 147) colore pendant quelques minutes dans une teinture composée de 3 parties d'alcool absolu avec 1 partie de solution d'éosine dans l'eau, à 0,5 p. 100, puis, après lavage, il colore pendant cinq minutes dans une solution aqueuse de vert de méthyle, à 0,5 p. 100. On lave et l'on passe par l'alcool et un agent éclaircissant pour monter dans le baume. Les préparations ne se conservent pas bien dans la glycérine.

On peut également employer une solution alcoolique de vert de méthyle (3 parties d'alcool absolu avec une partie de la solution de vert de méthyle dans l'eau).

En général, il faut retirer les préparations de l'alcool absolu aussitôt que la couleur de l'éosine commence à reparaître.

On peut aussi employer (*loc. cit.*, p. 150) une teinture faite en allongeant la solution aqueuse de vert de méthyle de 50 volumes d'eau, et y colorer pendant vingt-quatre heures.

Pour le mélange de Rhumbler et ses résultats étonnants voyez *Zool. Anz.*, 1893, p. 47, 57-62.

255. Brun Bismarck et vert de méthyle (List, *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 145). — Colorer pendant quelques minutes dans une solution de brun Bismarck, formule de Weigert (n° 113 *bis*), laver, et colorer au vert de méthyle (sol. aq. à 0,5 p. 100).

Ou bien, colorer pendant quelques minutes dans une teinture composée de trois parties d'alcool absolu et une partie de la solution de brun Bismarck selon Weigert, laver à l'alcool fort, et colorer

Digitized by Google

pendant quelques minutes dans une teinture composée de trois parties d'alcool absolu et une partie de la même solution de vert de méthyle.

Ou bien, colorer pendant vingt-quatre heures dans une teinture faite en allongeant le brun Bismarck de Weigert de 50 volumes d'eau, puis colorer pendant vingt-quatre heures dans une teinture faite en allongeant la solution précitée de vert de méthyle de 50 volumes d'eau.

Éclaircir par l'essence de bergamote ou le xylol, et monter au baume.

256. Fuchsine et bleu de méthylène. — *Méthode de* BAUMGARTEN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 415). — Les coupes de tissus durcis par l'acide chromique sont placées pendant vingt-quatre heures dans une solution alcoolique concentrée de fuchsine étendue d'eau (8 à 10 gouttes dans un verre de montre rempli d'eau), puis lavées rapidement dans l'alcool absolu. On les traite ensuite par une solution aqueuse concentrée de bleu de méthylène pendant quatre à cinq minutes, puis par l'alcool absolu pendant cinq à dix minutes et finalement par l'essence de girofle. Le bleu de méthylène enlève la coloration rouge de la substance fondamentale des tissus et laisse les noyaux colorés en rouge.

257. Bleu de méthylène et éosine (CHENZINSKY, cité d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 260). — Ne se conserve que pendant une huitaine de jours. (Voyez numéro 747.)

Bleu de méthylène, solution saturée aqueuse. . .	40	grammes.
Éosine, 0,5 p. 100 dans de l'alcool à 70 p. 100 . .	20	—
Eau distillée (ou glycérine)	40	—

Le mélange de PIANESE (*Riforma med.*, 1893, p. 828; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 3, 1894, p. 345) contient les mêmes ingrédients dans les mêmes proportions, avec une forte addition de carbonate de lithine.

258. Autres combinaisons. — Nous laissons de côté bon nombre de mélanges qui nous paraissent inutiles ou superflus, mais voyez au besoin les suivants :

Eosine et vert d'aniline (SCHIEFFERDECKER, *Arch. f. mik. Anat.*, 1878, p. 30). — **Eosine et dahlia** (SCHIEFFERDECKER, *Arch. f. mik. Anat.*, 1878, p. 30). — **Eosine et violet de méthyle** (SCHIEFFERDECKER, *loc. cit.*). — **Rose Bengale et vert d'iode** (GRIESBACH, *Zool. Anzeig.*, 1883, p. 172). — **Hématoxyline et nitrate de rosaniline** (LIST, *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, p. 149). — **Brun Bismarck et vert d'aniline** (LIST, *loc. cit.*). — **Vert de méthyle et nitrate de rosaniline** (LIST, *loc. cit.*). — **Bleu de Prusse et safranine** (BRUN, *Arch. Sc. Phys. et Nat.*, XIII, 1885, p. 257).

Digitized by Google

Resegotti (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 320) a obtenu des teintures doubles en colorant d'abord dans la fuchsine, le dahlia, le violet de méthyle, le violet de gentiane, la rubine, le bleu victoria ou le magenta, et ensuite dans une solution *alcoolique* (si j'ai bien compris) de rouge Congo, vert de méthyle, vert d'iode, nigrosine, bleu de méthylène, orange, ponceau, fuchsine acide, aurantia, cyanine, éosine, éosine méthylique, rouge Magdala, Bordeaux, ou vésuvine. Il a eu les meilleurs résultats en colorant d'abord par le violet de méthyle, puis par une solution alcoolique très diluée d'éosine alcoolique ou de fuchsine acide, avec déshydratation par l'alcool pur.

Digitized by Google

CHAPITRE XIV

MÉTHODES D'INCLUSION

259. Les méthodes d'inclusion ou d'enrobage sont des procédés ayant pour but d'englober les objets petits ou délicats dans des substances plastiques qui les soutiennent de tous côtés de manière à permettre de les diviser en tranches minces sans les comprimer et sans déranger les rapports de leurs parties. Au début de cette branche de la technique, on ne visait qu'à entourer les objets par une substance de nature à leur prêter un support suffisant à l'extérieur, sans se préoccuper de faire pénétrer cette substance à l'intérieur pour prêter le même support aux éléments anatomiques; c'est là l'inclusion ou l'enrobage *simple*, méthode qui rend encore aujourd'hui des services pour les coupes d'objets dont l'intérieur ne se laisse pénétrer par aucune des masses d'inclusion connues, comme, par exemple, l'encéphale humain entier. Mais la technique moderne n'en est pas restée là. Mettant en œuvre des procédés d'infiltration, on réussit aujourd'hui à remplir avec la masse d'inclusion toutes les cavités qui peuvent exister dans un organisme, à entourer chaque organe et chaque élément, à en pénétrer même la substance des cellules. Par ce moyen, on communique aux tissus une consistance qui permet de les débiter en tranches très minces dans lesquelles les rapports naturels de tous les organes et de tous les éléments se trouvent exactement conservés.

On arrive à l'une ou l'autre de ces fins par l'emploi de *masses d'inclusion* appropriées au but qu'on se propose. A ce point de vue, on peut distinguer deux groupes de masses d'inclusion : les masses *aqueuses*, telles que la gomme arabique, la gélatine, le savon, qui se laissent mêler à l'eau, et servent à enrober et à infiltrer des tissus sans les déshydrater ; et les masses *anhydres*, telles que la paraffine, la cire, le collodion, qui peuvent bien effectuer le simple enrobage

Digitized by Google

d'objets humides, mais qui ne sauraient les infiltrer qu'à condition d'une déshydratation préalable. L'emploi de masses humides est souvent nécessaire dans les recherches cytologiques, et souvent très commode, quelquefois même nécessaire, en physiologie et en pathologie; les masses anhydres, au contraire, se prêtant mieux à la préparation des séries de coupes, sont les plus employées en embryologie et en anatomie normale. Aujourd'hui c'est surtout la *paraffine* qui sert à ce genre de travaux.

260. Microtomes. — Le cadre de cet ouvrage exclut en principe toute description d'instruments. Nous pensons qu'il sera cependant utile de dire deux mots sur les microtomes avant de passer à l'exposé des manipulations spéciales des inclusions. Nous venons de dire que la méthode de la *paraffine* est la méthode normale de l'anatomie et de l'embryologie. Il s'ensuit que le microtome de l'embryologiste ou du zootomiste doit être fait en vue de l'emploi général de cette méthode.

Mais il doit *aussi* pouvoir servir au besoin pour la confection de coupes de matériel non déshydraté, ou enrobé dans une substance *moins dure* que ne l'est la paraffine, dans le collodion par exemple. La paraffine est une masse très dure, le collodion est une masse beaucoup moins dure, et plus ou moins élastique. Des masses aussi dissemblables ne se laissent pas couper avec la même facilité et la même perfection au moyen de dispositifs mécaniques identiques. Il en résulte que tel microtome qui donne avec la paraffine les coupes les plus parfaites qu'il soit possible de réaliser est très impropre à couper le collodion ou autre masse *tendre et élastique*. En conséquence, à moins que l'anatomiste ne puisse disposer de deux microtomes, l'un pour la paraffine, l'autre pour le collodion, les tissus frais ou congelés, etc. (ce qui sera bien), il fera mieux de choisir un modèle n'ayant peut-être pas les qualités spéciales que seul peut avoir un instrument imaginé en vue d'un genre de travail très spécial, mais qui donne des résultats suffisamment bons en même temps avec la paraffine et avec les masses molles.

Parmi les microtomes les plus connus qui remplissent ces conditions, nous citerons celui de Zeiss, celui de Reichert, à Vienne, celui de Schanze, à Leipzig (excellent, d'un emploi très facile, et aussi très bon marché, car il ne coûte, si nous ne faisons erreur, que 80 marks, soit 100 francs). Mais à notre sens, le microtome qui répond le mieux aux besoins de l'anatomiste général, est celui de Thoma, construit par Jung, de Heidelberg. Nous ne saurions mieux conseiller le lecteur qu'en l'engageant à se commander chez Jung (*adresse* R. Jung, Mechaniker, in Heidelberg) un microtome Thoma *modèle moyen*, soit n° 2ª ou 4, avec toutes les améliorations les plus récentes, y compris la vis micrométrique à tambour enregistrant, perfectionnement que nous pouvons assurer, d'après notre expérience, n'être nullement une superfluité. On trouvera une description détaillée de ce bel instrument dans le *Journal de Micrographie* de novembre et décembre 1883. Ou bien celui de Aug. Becker à Göttingen, dont on trouvera une description dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 453, ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 334. Ce modèle est en principe le même que celui de Thoma, mais possède quelques changements de détail qui sont des perfectionnements. L'un et

Digitized by Google

l'autre de ces instruments coupent les masses tendres comme le collodion tout aussi bien que la paraffine; ce sont même à peu près les meilleurs instruments qui existent pour cette fin. Avec la paraffine, ils fournissent un travail assez bon, mais qui ne saurait être comparé pour la finesse et la régularité à celui des microtomes de Cambridge, de Minot ou de Reinhold-Giltay. Dans celui de Thoma ou de Becker, le couteau est mobile, il n'est maintenu qu'à l'une de ses extrémités, et il n'est pas assujetti sur le fond de la rainure dans laquelle il glisse. Ce dispositif lui permet de céder, d'une quantité minime il est vrai, mais c'est toujours trop, à l'instant où son tranchant rencontre l'objet à couper. Il ne le fait pas toujours à un degré perceptible, mais il le fait souvent, surtout si l'objet est un peu dur ; d'où une irrégularité quelquefois fort désagréable dans l'épaisseur des coupes. Dans les instruments que nous allons maintenant mentionner, cet inconvénient n'existe pas ou existe à un degré moindre ; car, dans ces modèles, le couteau est immobile et solidement assujetti à ses deux extrémités.

Dans ces modèles, nous recommandons en premier lieu pour la plupart des recherches qui demandent la préparation de *séries de coupes à la paraffine*, le nouveau microtome à bascule vendu par la « Cambridge Scientific Instrument Company », sous le nom de *Rocking Microtome*. (Ce microtome est aussi construit en France par Dumaige, 24, rue Saint-Merri.) Ce microtome fournit avec une grande facilité des séries de coupes d'une admirable régularité, et se prête mieux que le microtome Thoma à la production rapide de coupes enchainées ou de rubans de coupes collées ensemble, sujet sur lequel nous reviendrons tout à l'heure, mais il n'offre pas de dispositions aussi heureuses pour l'orientation exacte d'objets très petits. Cet inconvénient se trouve en partie écarté par les perfectionnements apportés à la construction du porte-objet par Henneguy et Vignal (*Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1885, p. 647). Ce microtome ne s'applique du reste guère qu'à la confection de séries de coupes par la méthode de la paraffine, et n'est pas à recommander pour les coupes qui doivent se faire par la voie humide avec un rasoir mouillé, comme pour le procédé au collodion.

Ensuite les beaux instruments de Minot et de Reinhold-Giltay. Dans ceux-ci comme dans le *Cambridge Rocker*, le couteau est fixe et le porte-objet mobile, mais celui-ci a un mouvement vertical produit par un mécanisme semblable à celui d'une machine à coudre. L'un et l'autre sont des instruments d'une grande beauté, et très pratiques. Le Minot est fabriqué par E. Zimmermann, 10, Albert-Strasse, Leipzig, au prix de 175 m. (220 francs). On en trouvera une description dans le *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1889, p. 143. Le Reinhold-Giltay ressemble essentiellement au Minot, mais possède des perfectionnements dans le détail mécanique qui le rendent plus précis et moins délicat. Je n'ai pas eu l'occasion de travailler moi-même avec cet instrument, mais je l'ai vu à l'œuvre, et je puis affirmer que je lui ai vu débiter un bloc de paraffine de plus d'un centimètre de côté en un ruban de coupes à *un micron* d'épaisseur, et cela avec un rasoir ordinaire. Les coupes étaient toutes parfaites si ce n'est que quelques-unes étaient un peu tassées. C'est de bien loin ce que j'ai vu de plus beau en fait de microtomes. Il y a aussi un dispositif pour permettre de couper les masses au collodion, etc. Cet instrument est fabriqué par J. W. Giltay à Delft, et coûte, je crois, environ 500 francs. On en trouvera une description dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 4, 1893, p. 445, et dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1893, p. 706.

Digitized by Google

261. Les manipulations de l'inclusion. — Avant de décrire en détail les plus importantes des méthodes d'inclusion, nous dirons quelques mots des procédés opératoires généraux de l'inclusion, c'est-à-dire des manipulations employées pour introduire l'objet dans la masse liquide d'inclusion de telle sorte que la masse devenue solide se présente sous la forme d'un bloc commode à couper et emprisonnant l'objet dans l'orientation voulue.

a. On peut faire l'inclusion dans une capsule ou dans un verre de montre, quitte à découper ensuite dans la masse solide un bloc contenant l'objet et ayant les dimensions voulues. Si l'on s'est servi d'une masse liquide à chaud, solide à froid, telle que la paraffine, on peut le plus généralement la retirer en totalité en chauffant légèrement le fond de la capsule ou du verre de montre de manière à fondre la couche inférieure de la masse, ce qui permet de détacher en bloc le reste de la masse.

Si l'on désire procéder de cette manière, il est bon, selon certains anatomistes, d'enduire le récipient, d'avance, avec de la glycérine. On y verse une goutte de glycérine, qu'on étale et qu'on essuie ensuite avec un linge jusqu'à ce qu'il n'en reste que des traces à peine perceptibles. J'ai toujours trouvé que pour la paraffine cette précaution n'est nullement nécessaire ; il est même rarement nécessaire de chauffer le fond du récipient, la paraffine se détache d'habitude parfaitement bien sans cela.

b. Les *petits objets* se laissent parfaitement bien enrober et orienter dans les masses telles que la paraffine sans aucun appareil. On pratique dans un bloc de paraffine une cavité assez grande pour recevoir l'objet, et on l'y place dans la position désirée. Il n'y a plus qu'à promener une aiguille chauffée le long des marges de la cavité pour que la paraffine fondue vienne entourer l'objet et achever l'inclusion sans déranger l'orientation de l'objet. Nous engageons vivement le lecteur à ne pas mépriser cette méthode si simple, car il est des cas où elle rend des services que ne rend aucune autre méthode. Lorsqu'on a affaire à des objets si petits qu'on ne peut distinguer leur position qu'à l'aide d'une forte loupe, il est essentiel de savoir manier l'aiguille chauffée sous le microscope à dissection et même sur le porte-objet du microtome [1].

c. D'après une méthode qui est très répandue, et qui est excel-

[1] Dans *The Microtomist's Vade Mecum*, 1885, p. 172, nous avons appelé cette méthode du nom de Kingsley. Nous pensons maintenant qu'il convient de l'attribuer à Born. Voyez *Die Plattenmodellirmethode*, dans *Arch. f. mik. Anat.*, 1883, p. 591.

Digitized by Google

lente, l'inclusion se fait dans de petites boîtes de papier, de carton ou de papier de plomb. On construit facilement ces boîtes de la manière suivante : on prend un morceau de papier ou de carton ayant approxi-

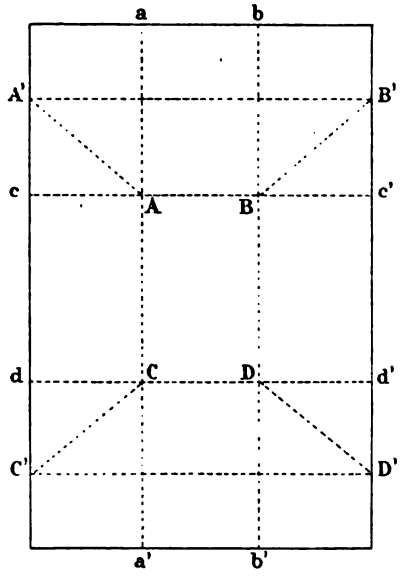


Fig. 1.

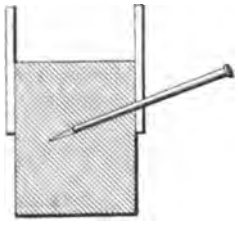


Fig. 2.

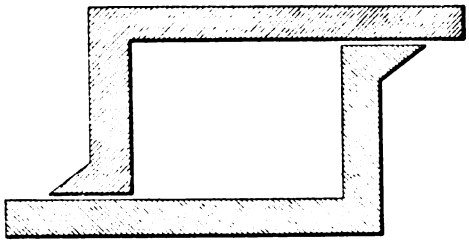


Fig. 3.

mativement la forme du dessin ci-contre (fig. 1.) ; les vieilles cartes correspondance peuvent bien servir. On le plie selon les lignes aa' et bb', puis selon cc' et dd', toujours vers le même côté. Puis on fait les plis AA', BB', CC', et DD' qui sont également des plis faits vers le même côté ; on les obtient en appliquant Ac contre Aa et en pinçant le long de la ligne AA', et ainsi de suite pour les autres angles. Cela

Digitized by Google

donne une boîte incomplète avec des oreillettes aux angles ; pour la compléter, on retourne les oreillettes en dehors, et on les applique contre les petits côtés de la boîte ; pour les assujettir dans cette position et achever la boîte, il n'y a plus qu'à rabattre en dehors, et pincer, contre les petits côtés, les bouts débordants, c'est-à-dire, tout ce qui est en dehors des lignes A′ B′ et C′ D′.

Les boîtes ainsi construites se laissent facilement défaire sans se briser, pour mettre à nu le bloc de masse d'enrobage solidifié, et peuvent servir à plusieurs inclusions; celles qui ont servi sont souvent meilleures que les neuves.

d. Une autre sorte de boîte très commode se fait en entourant un bouchon d'une collerette de papier tenue en place par une épingle. La collerette se fait d'une bande de papier dont on fait passer plusieurs tours autour du bouchon, qu'elle déborde de la hauteur voulue (fig. 2).

Pour faire l'inclusion dans ces boîtes, on peut ou bien y placer d'abord l'objet et le maintenir dans une position voulue au moyen d'épingles, après quoi on verse la masse liquide qu'on laisse solidifier avant de retirer les épingles ; ou bien, on verse dans la boîte un peu de masse qu'on laisse devenir assez solide pour que l'objet ne s'y enfonce pas trop, on pose l'objet sur cette couche, et l'on verse le reste de la masse.

e. Leuckart, de son côté, fait usage de boîtes métalliques à parois mobiles. Elles sont composées de deux pièces métalliques (le mieux en laiton, et creuses pour ne pas absorber trop de chaleur) ayant la forme qu'on leur voit sur la figure 3. Pour faire une boîte avec ces formes, on les enduit de glycérine et on les pose sur une plaque de verre également enduite de glycérine, en les rapprochant de manière à former un rectangle de la superficie voulue. Il est évident qu'on peut varier à volonté la longueur de la boîte avec la même paire de formes, mais, pour varier la hauteur de la boîte, il faut employer d'autres formes. Pour faire l'inclusion dans ces boîtes, on chauffe tout l'appareil, verre et pièces métalliques, on place l'objet, on verse la masse fondue, puis, avec une aiguille chauffée, on donne à l'objet la position voulue, on laisse refroidir, et, après refroidissement, on n'a plus qu'à écarter les parois de la boîte pour obtenir un moule englobant l'objet et prêt à être coupé.

Cette méthode est surtout utile parce qu'elle donne un moyen assez commode d'*orienter* de petits objets, même sous le microscope à dissection, la masse à inclusion étant facilement maintenue à l'état liquide par le chauffage ; on peut chauffer l'appareil de temps à autre

Digitized by Google

avec la flamme d'une lampe à alcool, ou bien employer un dispositif permettant de le chauffer par la circulation d'un courant d'eau chaude, comme dans les formes connues de platines chauffantes.

f. SELENKA a décrit et figuré un appareil très simple visant au même but. C'est un tube de verre à travers lequel on fait passer un courant d'eau chaude, une dépression centrale servant à recevoir la paraffine (voyez description et figures dans le *Zool. Anzeig.*, 1885, p. 419). Une modification de cette méthode a été décrite par ANDREWS dans *Amer. Natural.*, 1887, p. 101 (Cf. *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 375).

Nous décrirons plus loin des procédés d'*orientation* s'appliquant spécialement à la méthode de la paraffine et à la méthode du collodion respectivement.

262. Choix d'une méthode. — Nous avons déjà fait entendre plus d'une fois que parmi les nombreuses méthodes d'inclusion qui ont été imaginées il y en a deux qui sont d'une importance capitale, la méthode de la paraffine, et celle du collodion. Les avis sont encore partagés sur la valeur respective de ces deux méthodes.

Il nous paraît évident que chacune de ces méthodes a ses qualités, et les défauts de ses qualités. Le collodion ne fournit pas avec de petits objets des coupes aussi minces, et cela de bien loin, que celles qu'on peut obtenir avec la paraffine. Il est difficile avec le collodion d'obtenir des coupes de moins de 7 microns d'épaisseur ; tandis qu'avec la paraffine on en fait de 1 micron. Il est donc obligatoire de prendre la paraffine pour tout travail qui demande des coupes très minces. Et l'on peut dire que de nos jours c'est un cas qui se présente très souvent. D'un autre côté, la paraffine ne fournit des coupes très minces qu'avec de petits objets ; avec de gros objets, ceux de plus de 15 millimètres de côté, il est difficile d'obtenir des coupes plus fines qu'avec le collodion ; les coupes faites dans de grands blocs de paraffine ayant une tendance à se fendre ou à se tasser. Pour de grands objets donc le collodion donne de meilleurs résultats.

Quelques auteurs croient que le collodion est plus inoffensif envers les tissus que la paraffine. Après bien des comparaisons je n'ai pas pu établir une différence sensible à cet égard.

Nous pensons donc qu'il faut admettre que la méthode de la paraffine est la méthode générale, et que le collodion doit être réservé pour les gros objets et pour certains cas spéciaux. On n'emploiera les masses aqueuses, telles que la gomme ou la gélatine, que pour des cas tout à fait spéciaux.

Digitized by Google

CHAPITRE XV

INCLUSION A LA PARAFFINE ET MASSES SEMBLABLES

(SAVON, GÉLATINE)

263. Pénétration des objets. — Le premier stade du procédé de la paraffine consiste dans la *pénétration des objets par un dissolvant de la paraffine*. C'est une partie très importante de la manipulation et qui demande à être faite avec beaucoup de soin. On fait en sorte que la pénétration soit graduelle, ou bien en mettant le liquide de pénétration sous l'alcool qui contient les objets, de la manière que nous avons expliquée au numéro 6, ou bien en passant les objets par des mélanges successifs d'alcool et de liquide de pénétration renfermant des proportions de plus en plus fortes de ce dernier. Il va sans dire qu'on ne doit opérer qu'avec des objets très scrupuleusement déshydratés.

Le choix d'un liquide de pénétration convenable est chose très importante. On emploie l'essence de térébenthine, l'essence de girofle, la créosote, la benzine, le xylol, le toluol (ou toluène), le naphte, l'essence de bois de cèdre, le chloroforme et d'autres. Ces liquides ont tous des propriétés qui les rendent plus ou moins propres à la pénétration, selon la nature des objets avec lesquels on les emploie.

La térébenthine pénètre bien et se mêle facilement à la paraffine, deux qualités importantes. De plus, elle ne rend pas les objets cassants, ce qui est une qualité précieuse. Mais ce réactif a le défaut, qui nous paraît très grand, d'altérer, peut-être à un plus haut degré qu'aucun autre, la structure des éléments délicats. Nous pensons qu'il doit être évité toutes les fois qu'on désire bien conserver la structure des cellules.

L'essence de girofle pénètre très énergiquement, et conserve bien la structure des cellules ; mais elle a deux défauts : elle a une grande

Digitized by Google

tendance à rendre les tissus cassants, et elle se mêle très lentement à la paraffine, ce qui nécessite des bains de paraffine très prolongés. Pour éviter cet inconvénient, Fol a recommandé de pénétrer d'abord par l'essence de girofle et ensuite par la térébenthine ; par ce moyen on arrive sans doute à pénétrer rapidement les objets et par l'essence et par la paraffine, mais il ne nous semble pas qu'on écarte l'action nuisible de la térébenthine que nous avons reprochée à ce réactif.

Nous n'avons pas d'expériences personnelles sur la créosote, la benzine et le xylol. La benzine a été récemment recommandée par Brass (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 301). D'après M. Heidenhain (*Kern und Protoplasma*, p. 114), le xylol serait très nuisible aux cellules ; il emploie l'essence de bergamote.

Le toluène a été préconisé par Holl (*Zool. Anzeig.*, 1885, p. 223). Holl trouve que ce liquide est très pénétrant. Selon Holl, il n'y aurait pas nécessité de rendre la pénétration graduelle en mettant le toluène sous l'alcool, ou en passant par des mélanges de toluène et d'alcool ; et il n'y aurait pas nécessité non plus de rendre graduelle la pénétration par la paraffine ; il met les objets pénétrés directement dans un bain de paraffine pure.

Le naphte a été recommandé par Webster (*Journ. of Anat. and Phys.*, XXV, 1891, p. 278). Pour les objets volumineux ce corps a l'avantage d'être très peu coûteux. L'auteur nous écrit que le naphte ordinaire du commerce suffit en général, mais que pour des travaux délicats la marque *Persian naphtha* (naphte de Perse) serait à préférer. Field et Martin (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, I, 1894, p. 10) recommandent un pétrole volatil, *Petroleum-æther*.

Le chloroforme possède de bonnes qualités ; il se mêle assez facilement à la paraffine, et après évaporation graduelle par la chaleur du bain de paraffine, il laisse après lui une paraffine très homogène et ayant très peu de tendance à cristalliser. Il a deux défauts qui deviennent très sérieux pour le cas de certains objets : il est si peu pénétrant que des objets volumineux ou peu perméables ne se laissent pénétrer qu'après un temps considérable, quelquefois même pas du tout ; puis il est nécessaire de l'éloigner ensuite très scrupuleusement des objets, soit par la chaleur, soit en changeant la paraffine, car la présence d'une trace même de chloroforme dans la paraffine suffit pour rendre la masse molle et impropre à fournir de bonnes coupes. Et cela demande beaucoup de temps : pour des objets volumineux jusqu'à deux jours ou plus. Le chloroforme doit donc être réservé pour les objets petits et perméables, pour lesquels on le trouvera en maintes occasions très commode.

Digitized by Google

On a aussi recommandé l'huile d'aniline (voyez au chapitre des *Agents éclaircissants*).

L'Essence de bois de cèdre (A. Bolles Lee, *Zool. Anz.*, 1885, p. 563) réunit à un haut degré les bonnes qualités de tous ces éclaircissants. Elle pénètre avec non moins d'énergie que l'essence de girofle ; elle conserve admirablement les caractères les plus délicats des cellules ; elle se mêle facilement à la paraffine ; et elle ne rend pas les tissus cassants, même après un séjour prolongé. Depuis que nous avons appris à connaître les propriétés de cette essence, nous l'employons à titre de liquide normal de pénétration pour les inclusions, et nous la recommandons particulièrement pour cet usage. Les cas pour lesquels on doit lui préférer le chloroforme sont rares. C'est toujours l'essence *épaissie* que j'emploie.

264. Bain de paraffine. — Les objets ayant été dûment pénétrés par un dissolvant de la paraffine, il s'agit maintenant de remplacer graduellement ce dissolvant par la paraffine fondue. Ce remplacement graduel peut se faire de deux manières, selon qu'il s'agit d'un dissolvant volatil comme le chloroforme, ou d'un dissolvant qui ne l'est pas, comme l'essence de cèdre.

Dans l'emploi de l'essence de cèdre ou de térébenthine ou d'un autre liquide non volatil, voici comment on procède d'habitude. Les objets sont mis dans un mélange de paraffine et d'essence fondant à une température peu élevée, par exemple 35° C., et on les laisse dans ce mélange, maintenu à la température voulue à l'aide d'un bain-marie ou d'une étuve à température constante, jusqu'à ce qu'ils en soient pénétrés. On peut déjà porter la température de ce bain préliminaire à celle du point de fusion de la paraffine choisie pour la masse d'inclusion définitive, mais on fera bien de ne pas dépasser cette limite. Un mélange convenable pour ce premier bain peut se faire avec des parties égales d'essence et de paraffine dure, c'est-à-dire fondant à 50° environ. Ou bien, on peut suivre la pratique de quelques naturalistes qui emploient non un mélange de paraffine avec un dissolvant, mais une paraffine pure fondant à une température suffisamment basse. On trouve maintenant dans le commerce des paraffines fondant à 36° C. Lorsqu'on croit que les objets sont dûment saturés de ce mélange, ou de paraffine molle, on les porte dans la masse définitive dont on veut se servir pour les coupes, et on les y laisse, à la température de fusion de la masse, jusqu'à ce qu'ils en soient parfaitement pénétrés. Il est quelquefois nécessaire de leur donner un troisième bain de paraffine pure pour enlever

Digitized by Google

jusqu'aux dernières traces du liquide de pénétration. Ces opérations accomplies, on verse les objets et la masse dans une boîte d'inclusion, et l'on y oriente l'objet dans la position voulue, ou bien on laisse refroidir le tout dans le récipient qui a servi au dernier bain.

Nous aurons à revenir sur cette partie de la manipulation.

La durée de ces bains doit nécessairement varier selon la nature de l'objet et son volume. Un embryon de la grosseur d'un pois doit être parfaitement pénétré par un séjour de trente minutes dans le mélange et d'une heure dans la paraffine pure fondant à 45° C., du moins si l'on emploie l'essence de cèdre.

Je dois dire ici que toute cette pratique de bains successifs de mélanges d'essence et de paraffine me paraît être en général *superflue*. Avec l'essence de cèdre en tout cas, aucun mélange n'est nécessaire, et l'on peut porter directement dans la paraffine fondue. La pratique de bains successifs de paraffine molle et de paraffine dure me paraît *entièrement illusoire*.

Si l'on emploie le chloroforme, on peut également suivre la marche que nous venons de décrire, si on le désire. Ainsi, on peut employer avec Bütschli, un bain préliminaire d'un mélange à parties égales de paraffine dure et de chloroforme, mélange fondant à 35° environ, suivi d'un bain de paraffine pure. Mais il vaut mieux profiter de la volatilité du chloroforme, et employer la méthode élégante de Giesbrecht et de Bütschli (*Zool. Anzeig.*, 1881, p. 484; *Biol. Centralbl.*, 1881, p. 591). Les objets, ayant été soigneusement déshydratés par l'alcool absolu, sont pénétrés de chloroforme, auquel on peut ajouter en cas de nécessité un peu d'éther sulfurique pour les empêcher de flotter. On chauffe le tout au bain-marie et l'on ajoute au chloroforme par intervalles de petits morceaux de paraffine. A mesure que la paraffine fond, on en ajoute et l'on continue à le faire aussi longtemps que des bulles de vapeur se dégagent des objets. Lorsque les bulles ne se forment plus, on peut être sûr que les objets sont pénétrés de paraffine. Il ne reste plus qu'à chasser le chloroforme, ce qu'on fait en continuant à chauffer, à la température de fusion de la paraffine, jusqu'à ce que tout le chloroforme soit entièrement volatilisé. Il est urgent que le chloroforme soit entièrement chassé, car, s'il en reste une trace dans la paraffine, celle-ci reste si molle qu'il est impossible d'en obtenir de bonnes coupes. Pour savoir si tout le chloroforme est volatilisé, il suffit de plonger une aiguille chauffée dans la masse; elle ne doit pas provoquer un dégagement de bulles.

L'évaporation du chloroforme est une opération souvent très longue; avec des objets un peu volumineux elle exige des jours

Digitized by Google

entiers. C'est pour ce motif, entre autres, que nous pensons que la méthode du chloroforme n'est indiquée que pour les objets très petits.

265. Etuves et bains-marie. — Il est important que la paraffine ne soit pas exposée à une atmosphère humide pendant qu'elle est à l'état liquide. Si donc on fait usage d'un bain-marie pour les inclusions, celui-ci doit être agencé de manière à ne pas exposer la paraffine à la vapeur d'eau. Un modèle très commode est celui de Paul Mayer, dont on trouvera une description dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 146.

On peut se le procurer pour un prix peu élevé en s'adressant à la direction de la Station zoologique de Naples, ou à la Maison PAUL ROUSSEAU, 24, rue des Fossés-St-Jacques, à Paris. Mais il vaut toujours mieux se servir d'une étuve. Nous recommandons particulièrement le modèle dont on trouvera une description dans le *Lehrbuch* de FOL, p. 121. On trouvera dans la *Zeit. f. wiss. Mik.* ou dans le *Journ. Roy. Mic. Soc.* et autres journaux techniques de ces dernières années de nombreuses descriptions d'étuves thermostatiques. La plupart de ces appareils sont construits pour le chauffage au gaz. Pour les laboratoires qui ne possèdent pas de gaz, citons l'appareil chauffable au pétrole fabriqué par F. SANTORIUS à Göttingen (*Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 161), et celui d'ALTMANN (*ibid.*, p. 221 ; Cf. *Centralb. f. Bacteriol.*, etc., XII, 1892, p. 654), également construit pour le pétrole.

266. Inclusion dans le vide. — Il est des objets qui, soit à cause de leur grosseur, soit à cause de leur structure, ne se laissent pas pénétrer par la paraffine employée de la manière ordinaire, même après des heures ou des jours de séjour dans le bain de paraffine. Pour ces objets il convient d'employer la méthode dite « de l'inclusion dans le vide », ou mieux « à basse pression », méthode qui a non seulement l'avantage de garantir une pénétration complète en un temps très court, — quelques minutes, mais aussi celle de *prévenir les effondrements* de tissus qui peuvent facilement avoir lieu dans l'inclusion d'objets qui possèdent des cavités internes, quand on emploie la méthode ordinaire. En principe, cette méthode consiste à faire passer l'objet dans des bains de paraffine placés dans le vide ; on y arrive avec un dispositif quelconque permettant de maintenir la paraffine à l'état liquide. On trouvera dans le *Zool. Anzeig.*, 1884, p. 230, une description avec figures du dispositif employé par HOFFMANN. Dans cet arrangement, le vide est produit par une pompe pneumatique aspirante à eau, les baquets contenant la paraffine étant placés dans un dessiccateur maintenu au bain-marie et percé d'une ouverture par laquelle passe un tube qui le met en rapport avec la pompe aspirante. Cet appareil, qui est très simple et efficace, demande cependant qu'on ait à sa disposition de l'eau sous forte pression. Pour remédier à cet inconvénient, FRANCOTTE a imaginé un dispositif très simple qui permet de produire un vide suffisant par la condensation de la vapeur d'eau. On en trouvera la description avec la figure dans le *Bull. Soc. Belge Micr.*, p. 45.

FOL (*Lehrb.*, p. 121) emploie la pompe aspirante à eau de la manière proposée par Hoffmann, mais il a simplifié l'appareil pour la réception de l'objet. Au lieu de mettre les objets avec la paraffine dans des baquets qu'on

Digitized by Google

introduit dans le dessiccateur où se fait le vide, Fol met l'objet avec la paraffine dans un tube de verre à forte paroi, fermé par le bas (une petite éprouvette) et muni en haut d'un bouchon de caoutchouc traversé par un tube qui le met en communication avec la pompe. L'éprouvette plonge dans un récipient contenant de l'eau à la température de fusion de la paraffine. On fait le vide une ou deux fois, on attend cinq à trente minutes, ou jusqu'à ce que l'on constate qu'il ne se forme plus de bulles d'air autour de l'objet; puis on laisse entrer l'air, on jette la paraffine qui a acquis une consistance anormalement dure, et on refait l'inclusion dans de la paraffine fraiche d'après la méthode ordinaire.

Voyez aussi au besoin la méthode de PRINGLE, dans *Journ. of Path and. Bacteriol.*, 1892, p. 117, ou dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 893.

267. Inclusion définitive et orientation. — Aussitôt que les objets sont bien et dûment pénétrés de la paraffine, on procède à l'inclusion définitive selon l'une des méthodes qui ont été exposées au numéro 261. Si l'on a choisi le procédé du verre de montre, et si l'on a donné le bain de paraffine dans ce récipient même, il ne sera pas en général nécessaire de passer à une manipulation spéciale d'enrobage; il n'y a plus qu'à refroidir la masse et en découper un bloc contenant l'objet.

Mais il se peut que l'on ait besoin de donner à l'objet une position déterminée et reconnaissable par la suite dans la paraffine; en d'autres termes, il se peut qu'on ait besoin d'un procédé d'*orientation*. Le numéro 261 a donné des indications suffisantes pour permettre d'obtenir une orientation grossière mais généralement suffisante par la méthode des boites de carton ou par celle des boites métalliques. Voici maintenant un procédé dû à PATTEN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, I, 1894, p. 13) qui est susceptible de plus de précision, et permet d'orienter plusieurs petits objets dans le même bloc de paraffine. A cette fin, on commence par fixer les objets en position *avant* de les mettre dans le bain de paraffine. On les pénètre d'abord par l'essence de bergamote ou de girofle. On se procure du papier à lettres de cette sorte qui a des côtes élevées se croisant à angle droit. Ce doit être du papier glacé; mais à défaut de papier à côtes on peut prendre du papier lisse et le régler avec un crayon tendre. On prépare maintenant un mélange de collodion et essence de girofle, de la consistance de miel épais. On pose sur un petit rectangle du papier, une goutte de ce mélange, ou plusieurs gouttes si l'on opère avec plusieurs objets. On prend les objets, on les laisse égoutter et on les pose dans les gouttes de collodion, en donnant à chacun une position déterminée par rapport aux lignes du papier. Cela se fait au besoin sous la loupe ou même sous le microscope composé. Les objets gardent la position qu'on leur a donnée. Cette opération accomplie, on met le tout dans de l'essence de térébenthine, qui enlève l'essence de girofle et laisse les objets fixés dans le collodion. On passe au bain de paraffine, et après inclusion et refroidissement de la manière usuelle, on découpe un bloc de paraffine comprenant le papier. Le papier se laisse maintenant enlever sans peine, laissant la face inférieure de la paraffine

Digitized by Google

gravée des lignes d'orientation du papier, au-dessus desquelles se trouvent les objets dans l'orientation qu'on leur a donnée au commencement.

Une modification plus compliquée de cette méthode a été décrite par WOODWORTH, dans *Contrib. from the Zool. Lab. Mus. Comp. Zool., Harvard*, XXV, 3, 1893, p. 45.

Une méthode similaire a été décrite par FIELD et MARTIN, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, I, 1894, p. 11.

268. Refroidissement de la masse. — La pénétration des objets par la masse d'inclusion ayant été dûment accomplie, on doit procéder au refroidissement de la masse. C'est là un point auquel les anatomistes attachent en général une grande importance. Ils admettent que la paraffine est un corps cristallisable, et que, si on l'abandonne au refroidissement lent, il se forme très souvent des cristaux qui prennent naissance jusque dans l'intérieur des tissus, au grand détriment des structures délicates. Il serait donc nécessaire de surveiller le refroidissement et d'empêcher qu'il n'ait lieu lentement. Je crois qu'on a un peu exagéré l'importance de cette précaution.

Après avoir pratiqué comme les autres pendant de longues années le rite du refroidissement, j'en suis arrivé à douter de son importance et de son efficacité. J'ai eu souvent des masses excellentes après un refroidissement lent; et j'en ai eu de mauvaises après un refroidissement conduit selon les règles. M. LINDSAY JOHNSON, qui a fait de nombreuses expériences comparées sur ce sujet, a eu l'obligeance de m'écrire qu'apparemment la manière du refroidissement n'est qu'une cause minime de la formation de cristaux. Celle-ci serait provoquée, selon lui, par la présence d'une petite quantité de l'essence de pénétration demeurée dans la paraffine. En tout état de cause, si l'on désire prendre toutes les précautions possibles, voici comment on peut procéder pour le refroidissement :

Si les objets sont petits, on peut les sortir de la masse fondue avec aussi peu de paraffine que possible, à l'aide d'une spatule, et les laisser refroidir sur des lames de verre ou sur la spatule elle-même, puis les ajuster avec une aiguille chauffée sur un cylindre ou sur un cône de paraffine (voyez n° 261 (*b*) ; BORN, *Arch. für mik. Anat.*, XXIII, 1883, p. 591 ; BRASS, *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 301). Pour fixer les objets sur le cône de paraffine avec l'aiguille chauffée, il est bon d'observer la précaution de ne pas employer une aiguille chauffée au delà de la température nécessaire, et de ne faire fondre *que la plus petite quantité possible de paraffine;* moins on en fait fondre à la fois et plus elle se refroidit rapidement. En pratiquant cette méthode avec adresse, on obtient des préparations imbibées et entou-

Digitized by Google

rées d'une paraffine parfaitement homogène, sans cristaux et sans bulles.

Si l'inclusion s'est faite dans des boîtes de papier, on peut les mettre refroidir sur une plaque de pierre ou de métal, ou bien (CALDWELL) les mettre dans l'eau froide. Il faut en ce cas commencer par tremper seulement le fond de la boîte dans l'eau, et ne la submerger en entier que lorsque la paraffine est prise ; autrement on verrait se produire dans la masse des creux qui se rempliraient d'eau. FRENZEL (*Arch. f. mik. Anat.*, XXV, 1885, p. 142) recommande de jeter la masse entièrement dans l'eau aussitôt qu'elle est suffisamment prise. GRAF SPEE (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885) fait l'inclusion de petits objets dans des verres de montre, qu'il met ensuite sur de l'eau froide. SELENKA refroidit ses objets en faisant passer un courant d'eau froide à travers le tube à inclusion dont nous avons parlé ci-dessus (n° 261 (*f*).

Je me trouve très bien du procédé des verres de montre; rien de plus simple que de les faire flotter sur de l'eau froide. Pour découper ensuite le bloc voulu, il est bon d'employer un scalpel *légèrement chauffé;* avec cette précaution la paraffine a moins de tendance à se briser ou à former des fentes qui peuvent endommager les objets.

Les auteurs admettent qu'il est bon de faire les coupes aussitôt que possible après le refroidissement complet de la masse, parce que la paraffine continue à cristalliser lentement même après refroidissement ; dans les blocs de paraffine qui ont été conservés pendant des semaines ou des mois on est exposé à trouver des cristaux très volumineux. C'est fort possible qu'il en soit ainsi, mais il est certain que l'inconvénient est rarement grave. J'ai des blocs vieux de plusieurs années enrobant des préparations qui se montrent aussi bien conservées que le premier jour.

269. Mise en coupes. — Les objets ayant été enrobés par un de ces procédés, et orientés dans la position voulue, et le refroidissement ayant été obtenu par une des méthodes indiquées, doivent maintenant être examinés avec soin. Il arrive souvent que la paraffine en se refroidissant forme autour des objets des bulles, des cavités, ou des taches opaques. On enlève les taches et l'on remplit les cavités en pratiquant avec une aiguille chauffée des piqûres autour de l'objet dans tous les endroits où la paraffine ne présente pas le degré d'homogénéité voulue ; il faut même quelquefois promener l'aiguille entièrement autour de l'objet. Aussitôt que la paraffine ainsi fondue s'est complètement refroidie, les manipulations de l'enrobage sont terminées, et l'on peut procéder à la mise en coupes.

Digitized by Google

Les **coupes** d'objets enrobés par l'infiltration avec la paraffine se font *à sec*, c'est-à-dire avec un couteau qui n'est ni mouillé d'alcool ni d'aucun autre liquide.

Enroulement des coupes. — Les coupes faites de cette manière ont une grande tendance à s'enrouler sur la lame du couteau et à former ainsi des rouleaux qu'il est toujours difficile et souvent impossible d'étaler sans les briser. Voici quelques indications qui peuvent aider à parer à cet inconvénient.

Le couteau doit, autant que possible, avoir une position transversale, faisant un angle droit avec la ligne de section ; car les couteaux obliques provoquent ou du moins facilitent l'enroulement.

La paraffine doit posséder un degré de *dureté proportionné à la température du laboratoire.* Nous avons trouvé qu'une paraffine ayant son point de fusion à 45° C. est celle qui convient lorsque la température du laboratoire se trouve entre 15 et 17° C. Pour une température de 22° C. il faut une paraffine fondant à 48° C. [1]. Nous avons établi ces températures d'après des observations faites dans un laboratoire chauffé par une cheminée ouverte ; il est possible qu'elles ne s'appliquent pas parfaitement aux pièces chauffées par des poêles, qui sont dans des conditions très différentes à l'égard du rayonnement de la chaleur. Et nous les avons établies d'après des expériences faites avec le microtome Thoma. Les microtomes à couteau fixe (Cambridge, Minot, etc.) permettent l'emploi d'une paraffine beaucoup plus dure. D'après notre expérience, l'emploi d'une masse convenable est le plus pratique de tous les moyens qui ont été proposés pour empêcher l'enroulement des coupes.

Si, après qu'on a commencé de faire les coupes, on s'aperçoit que la masse n'a pas été convenablement choisie, on peut encore la corriger sans déranger l'objet. Si la masse est trop dure, il faut placer près du microtome une lampe munie d'un réflecteur parabolique à l'aide duquel on projette sur l'objet les rayons calorifiques de la flamme de la lampe. La température convenable s'obtient en approchant ou éloignant la lampe. Si, au contraire, la masse s'est montrée trop molle, on peut la durcir en plaçant au foyer d'un réflecteur pareil un morceau de glace au lieu de source de chaleur (Fol, *Lehrb.*, p. 123). Il suffit du reste souvent de modifier la température de l'appartement en ouvrant ou en fermant une fenêtre, ou de changer la position du microtome de manière à le mettre plus au frais ou plus au chaud.

[1] Des paraffines ayant approximativement ces points de fusion sont faciles à trouver dans le commerce. On peut aussi s'en procurer en combinant dans les proportions voulues une paraffine très dure et une paraffine très molle. Pour faire une masse fondant à 45° C. on peut prendre deux parties de paraffine fondant à 50°, et une partie de paraffine fondant à 36°.

Digitized by Google

On a proposé des masses spéciales ayant moins de tendance à s'enrouler que la paraffine pure. Ainsi, on peut ajouter à la paraffine un peu de vaseline, environ un cinquième pour la paraffine dure. Nous ne recommandons pas ce moyen.

On peut éviter l'enroulement en faisant les coupes en chaînes ou rubans continus. Dans ces conditions il n'y a en général que la première coupe de la chaîne qui se roule. Nous décrivons ce procédé dans le numéro suivant.

On peut empêcher l'enroulement par des moyens mécaniques. Le plus simple, et à notre avis le meilleur, de ces moyens consiste à retenir avec une aiguille courbée, avec une languette de papier, ou, ce que nous préférons, avec un petit pinceau, le bord de la coupe qui commence à se rouler. Des appareils très ingénieux, consistant en des barres ou des rouleaux ajustés le long du tranchant du couteau, ont été proposés. Nous ne nous en servons pas et ne les recommandons pas; car outre qu'ils sont en général d'une construction compliquée et toujours difficiles à ajuster, nous leur reprochons d'aplatir et de tasser les coupes d'une manière nuisible pour les structures délicates. On trouvera la description du *Schnittstrecker* de F.-E. Schultze dans le *Zool. Anzeig.*, 1883, p. 100 ; de celui de Mayer, Andres et Giesbrecht dans *Mitth. a. d. Zool. Stat. Neapel*, IV, 1883, p. 429 ; de celui de Decker dans *Arch. f. mik. Anat.*, XXIII, 1884, p. 537 ; de celui de Francotte dans *Bull. Soc. Belge de Mic.*, X, 1883, p. 55 ; de celui de Gage and Smith dans *The Microscope*, Feb. 1884, et dans Whitman, *Methods of research in microscopical Anatomy*, 1885, p. 91 ; de celui de Strasser dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 2, 1887, p. 218 ; de celui de Born, *ibid.*, X, 2, 1893, p. 157, et dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1894, p. 132. Ce dernier nous paraît peut-être le plus recommandable de tous. Un petit dispositif très simple se fait en coupant la tête à une épingle ordinaire et en fixant cette épingle au moyen de deux petites pelotes de cire sur la surface de la lame et parallèlement à son tranchant. On en règle l'élévation en l'enfonçant plus ou moins dans la cire (cité d'après *Ref. Handbook of the Med. Sc.*, Supp., p. 440).

Enfin, on peut renoncer à empêcher l'enroulement, et se borner à le rendre moins nuisible. A cet effet, on taille le bloc de paraffine contenant l'objet en prisme à arête très aiguë, de manière à donner aux coupes la forme d'un triangle isocèle juste assez large à sa base pour contenir la section de l'objet et dont la hauteur ait au moins cinq ou six fois la longueur de la base. L'arête du prisme étant orientée vers le tranchant du couteau, on obtient des coupes enroulées dont les spires vont en s'élargissant du sommet à la base, la section

Digitized by Google

de l'objet se trouvant dans la dernière spire, qui est la plus ouverte. La coupe étant placée sur un porte-objet avec la dernière spire en bas, il suffit de chauffer légèrement pour que la partie contenant l'objet se déroule complètement. On éloigne le reste de la paraffine en la faisant fondre et en ajoutant un dissolvant.

Voici un des meilleurs procédés pour dérouler les coupes (HENNEGUY, *Journ. de l'Anat. et de la Phys.*, 1891, p. 398). Après avoir étalé au pinceau une couche d'albumine de MAYER aussi mince que possible sur le porte-objet, on laisse tomber sur celui-ci quelques gouttes d'eau distillée qu'on étale avec un agitateur tenu horizontalement. Les coupes sont ensuite disposées en série à la surface de la couche d'eau. La lame de verre est portée sur la platine de l'étuve à inclusion, platine dont la température est de 45 à 50° C. En quelques instants les coupes se déplissent et s'étalent complètement sur le porte-objet. Celui-ci est alors placé à la partie supérieure de l'étuve, sur la lame de verre qui ferme le compartiment où sèchent les préparations, et dont la température ne dépasse guère 40° C. Au bout de dix minutes, un quart d'heure, toute l'eau est évaporée, et on peut alors faire fondre la paraffine et ajouter un dissolvant. Il est important que la paraffine ne fonde pas avant que toute l'eau soit évaporée, sans quoi les coupes n'adhèrent plus au porte-objet et risquent de se déchirer.

270. Coupes en chaîne. — Rubans de coupes. — Il arrive, dans certaines conditions, que si l'on fait une série de coupes sans enlever du couteau chaque coupe à mesure qu'elle se fait, mais en les laissant reposer sur la lame dans la position qu'elles y prennent d'elles-mêmes, on obtient une chaîne ou un ruban de coupes, chaque coupe se collant d'elle-même par ses bords antérieur et postérieur à celle qui la précède et à celle qui la suit. Des chaînes de coupes ainsi faites présentent sur les coupes isolées des avantages qui sont souvent d'une grande importance. La série se coupe beaucoup plus rapidement. Elle se laisse monter aussi beaucoup plus facilement, car pour placer la série sur le porte-objet, on n'a qu'à saisir la chaîne par un bout et la transporter intégralement sur la lame de verre. De plus, l'intégrité de la chaîne nous garantit l'intégrité de la série ; lorsque nous avons déposé sur le porte-objet une chaîne de coupes, nous pouvons être parfaitement certain qu'aucune coupe n'a été égarée, qu'aucune n'a été placée irrégulièrement, et que toutes ont gardé l'ordre de succession dans lequel elles ont été coupées. Pour les travaux embryologiques, on comprend à quel point cela est un avantage précieux.

Digitized by Google

Voici quelles sont, d'après notre expérience, les conditions nécessaires pour la production des chaînes de coupes.

1° La paraffine doit avoir une certaine consistance, c'est-à-dire qu'il faut employer une masse d'une dureté proportionnée à la température du laboratoire. Nous n'avons rien à ajouter à ce que nous avons dit à ce sujet plus haut, numéro 269.

On a recommandé de faire l'inclusion dans de la paraffine dure, d'en tailler un bloc contenant l'objet, puis d'entourer ce bloc d'une mince couche de paraffine molle, qu'on enlève ensuite des côtés du bloc, de sorte que les coupes présentent sur leurs bords antérieur et postérieur seulement une marge de paraffine molle plus propre à faciliter l'adhésion que ne l'est la paraffine dure. On obtient facilement la production d'une couche de paraffine molle autour du bloc en plongeant celui-ci pendant un instant dans de la paraffine molle fondue.

Spee, Brass et Foettinger recommandent une préparation spéciale de la paraffine d'inclusion. Nous parlerons plus loin de ces modes de préparation.

On a aussi proposé d'enduire d'une couche très mince de solution de baume du Canada le côté du bloc de paraffine qui est tourné vers le couteau.

L'une et l'autre de ces méthodes peuvent être utiles, mais aucune n'est indispensable en général.

2° Le bloc de paraffine doit être taillé de façon à avoir ses bords, antérieur et postérieur, parallèles au tranchant du couteau.

3° Le couteau doit avoir une position transversale, c'est-à-dire que son tranchant doit faire angle droit avec la ligne de coupe.

4° Il faut faire les coupes en succession aussi rapidement que possible, et surtout imprimer au couteau un mouvement très rapide. Pour réaliser cette condition, les microtomes de Caldwell, de la Cambridge Scientific Instrument Company, de Minot, Reinhold-Giltay, etc., se montrent d'un grand secours, mais ils ne sont nullement obligatoires ; on se tire bien d'affaire avec le microtome à glissement de Thoma ou de Schanze.

271. Collodionnage des coupes fragiles. — Malgré les plus grandes précautions prises dans la préparation préliminaire ainsi que dans la pénétration et l'infiltration, il arrive quelquefois que l'objet à couper est devenu cassant ou même friable ; il se brise devant le rasoir, ou ne donne que des coupes si friables qu'il est impossible de les monter sans déranger les rapports de quelques-unes de leurs parties. Les œufs surtout présentent assez souvent cet inconvénient. On y remédie en enduisant la surface de l'objet avant chaque coupe d'une mince couche de collodion, qui sert d'une manière parfaitement efficace à maintenir en position les parties des coupes les plus fragiles.

Digitized by Google

On avait débuté en déposant, avant chaque coupe, sur la surface libre de l'objet une goutte de collodion. Cette pratique a un inconvénient : la quantité de collodion employée ramollit la paraffine à un degré nuisible, et, de plus, en séchant, donne aux coupes une tendance à s'enrouler. Voici, d'après MARK (*Amer. Natural.*, 1885, p. 628 ; *Journ. Roy. mic. Soc.*, 1885, p. 738), comment il faut procéder :

Dans un petit flacon muni d'un pinceau qui passe à travers son bouchon et plonge, mais à une faible profondeur seulement, dans le collodion, on met un peu de collodion fluide. Le critère de la bonne consistance du collodion est que, quand on en applique une couche mince sur la paraffine, cette couche doit sécher en deux ou trois secondes, sans laisser de vernis luisant à la surface de la paraffine. Dans cet état, le collodion paraît ne pas produire de membrane à la surface de la paraffine, et ainsi ne cause pas de tendance à s'enrouler dans les coupes ; d'autre part, il paraît pénétrer la préparation à une certaine profondeur et en fixer les parties dans leurs positions. Pour maintenir le collodion à ce degré de consistance, on a sous la main un flacon d'éther, avec lequel on allonge le collodion aussitôt qu'il commence à laisser des traces luisantes sur la paraffine.

Tout étant prêt pour l'opération des coupes, on retire le pinceau du flacon de collodion, on l'exprime en l'essuyant sur le goulot du flacon, de manière à l'avoir chargé seulement de peu de collodion, et, sans tarder, on enduit rapidement la surface de la préparation d'une mince couche de collodion. Il faut avoir soin de ne pas collodionner les faces verticales du bloc de paraffine, et surtout celle qui est tournée vers l'opérateur, car si cela arrive, la coupe risque de s'attacher au couteau par ce bord et même d'être emportée et d'adhérer à la surface inférieure du couteau. Aussitôt que le collodion aura séché (nous avons dit que ce doit être en deux ou trois secondes), on fait une coupe. On retire le couteau, et, sans tarder, on passe une deuxième couche de collodion sur la surface nouvellement affranchie de la paraffine. Pendant que cette deuxième couche sèche, on enlève du couteau la première coupe et on la porte sur un porte-objet préparé avec le fixatif de SCHÆLLIBAUM en ayant soin de l'y poser avec la surface collodionnée en dessous. Puis on fait la deuxième coupe, et on répète toute la série des opérations que nous avons décrites. Avec un peu de pratique on peut arriver à faire des coupes en chaîne, en collodionnant chaque coupe.

HENKING (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 4, 1886, p. 478) reproche à ce procédé que l'éther du collodion ramollit la paraffine, et préfère une solution de paraffine dans l'alcool absolu. Ou bien, pour des objets extrêmement fragiles, comme les œufs des Phalangides, une solution très claire de gomme laque dans l'alcool absolu.

RABL (*ibid.*, XI, 2, 1894, p. 170) emploie de la paraffine surchauffée. maintenue à environ 100° C. au bain-marie. Ce procédé a aussi l'avantage d'empêcher l'enroulement des coupes.

HEIDER (*ibid.*, VIII, 4, 1892, p. 509 ; *Embryonalentw. von Hydrophilus*, p. 12) emploie une solution faite en mélangeant du collodion à un volume égal de solution sirupeuse de mastic dans l'éther, et en allongeant le mélange d'éther jusqu'à ce qu'il soit parfaitement liquide.

272. Nettoyage et montage des coupes. — Pour débarrasser les coupes de la paraffine dont elles sont infiltrées, nous avons le

Digitized by Google

choix entre de nombreux dissolvants de la paraffine. On emploie la térébenthine, la térébenthine chauffée, la créosote, un mélange de quatre parties de térébenthine avec une partie de créosote, un mélange de térébenthine et d'essence de girofle, le naphte, le pétrole, l'essence de bergamote, l'essence de cèdre et d'autres essences, l'alcool absolu chaud, la benzine, le xylol, et même (pour des coupes contenant très peu de paraffine), la solution de baume de Canada dans le xylol dont on se sert pour le montage. Personnellement, nous donnons au *xylol* la préférence sur tous ces dissolvants. Le naphte ne doit pas être employé pour les coupes destinées à être montées directement dans le baume, vu qu'il ne se mêle pas parfaitement avec cette substance.

Pour terminer la préparation, on chauffe le porte-objet (nous supposons qu'on y a déjà collé les coupes) au-dessus d'une petite flamme, et on le plonge aussitôt que la paraffine s'est fondue dans un tube de xylol ou autre dissolvant. Un séjour de quelques minutes ou même quelques secondes suffira pour éloigner la paraffine par le xylol. Il n'y a plus alors qu'à ajouter une goutte de baume et un verre à couvrir.

273. Résumé de la méthode de la paraffine. — Voici un exemple d'une inclusion à la paraffine réduite à sa plus simple expression, c'est-à-dire dépouillée de tous les procédés accessoires ayant trait à l'orientation, à la collodionisation et à la sériation des coupes, etc. Déshydratez un petit objet dans l'alcool absolu. Mettez dans un petit tube bas un peu d'essence de bois de cèdre (assez pour couvrir l'objet). Versez sur l'essence une quantité pareille d'alcool absolu. Mettez l'objet dans cet alcool. Laissez-le (au mieux en bouchant le tube) jusqu'à ce qu'il soit tombé au fond de l'essence de cèdre, et que sa surface ne montre plus de couches réfringentes brillantes dues au mélange imparfait des liquides. Enlevez l'alcool avec une pipette. Faites fondre de la paraffine dans un verre de montre et mettez-y l'objet. Ayez soin que la paraffine soit de la dureté que nous avons recommandée au numéro 269. Après quelque temps, portez l'objet dans un autre verre de montre avec une nouvelle quantité de paraffine fondue. Ayez bien soin de ne pas laisser monter la température au-dessus du point de fusion de la paraffine (la paraffine surchauffée subit une élévation de son point de fusion et devient plus dure). Aussitôt que vous pensez que l'objet doit être parfaitement pénétré de paraffine pure, faites flotter le verre de montre sur de l'eau froide. Après refroidissement, découpez avec un scalpel légèrement chauffé

Digitized by Google

un bloc de paraffine contenant l'objet. Avec une aiguille chauffée, fixez ce bloc sur un cône de paraffine déjà fondue dans le porte-objet du microtome. Il n'y a plus qu'à couper. Désirez-vous avoir les coupes en ruban ? Alors taillez soigneusement le bloc de paraffine en rectangle ; taillez tout près de l'objet sur trois côtés, mais laissez un petit mur de paraffine sur le quatrième. Mettez le couteau dans la position transversale. Orientez le bloc de sorte que le côté qui a le mur de paraffine soit tourné vers le tranchant du couteau et soit parallèle à lui. Coupez rapidement. Collez la série de coupes sur porte-objet par l'une des méthodes que nous donnons dans le chapitre XVII. Chauffez un instant sur la flamme. Mettez pendant cinq minutes dans un tube de xylol. Montez au baume ou passez à l'alcool pour colorer ensuite.

FORMULES DES MASSES D'INCLUSION

PARAFFINE ET MÉLANGES DE PARAFFINE

274. Paraffine pure. — Suivant nous, la paraffine *pure* forme, pour les travaux ordinaires, une masse bien préférable aux mélanges. Nous avons indiqué au numéro 269 les degrés de dureté de la paraffine qui nous paraissent les plus convenables. Aucune préparation spéciale de la paraffine n'est nécessaire en général.

275. Préparation de la paraffine pure (GRAF SPEE, *Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 8). — Graf Spee prend de la paraffine fondant à 50° C. environ. Il chauffe dans une capsule de porcelaine avec une lampe à esprit-de-vin jusqu'à ce qu'il se produise des vapeurs blanches désagréables et que le volume de la masse éprouve une légère réduction. Cela arrive en un laps de temps variant de une à six heures, selon la quantité de paraffine employée. La masse est devenue d'un jaune brun, et au refroidissement elle présente une surface de section graisseuse ou savonneuse au toucher. Le point de fusion de la masse s'est élevé de quelques degrés.

Spee recommande cette masse pour la production de coupes en chaînes. On la trouve toute faite chez GRÜBLER.

BRASS (*op. cit.*, p. 300) emploie de la paraffine vieillie, car il a remarqué que la paraffine qui a été gardée pendant des années a perdu la faculté de cristalliser. Je pense que cette observation est fondée.

Pour obtenir avec la paraffine du commerce une paraffine blanche, très dure et bien homogène, FOETTINGER (*Arch. de Biologie*, VI, 1885, p. 124) emploie un procédé compliqué qui ne nous a pas donné de bons résultats.

Digitized by Google

276. Paraffine et cérisine (SCHULGIN, *Zool. Anzeig.*, 1883, p. 21). — Paraffine fondant à 55° C. ; cérisine, q. s. Si la masse ainsi obtenue est trop dure, ajouter de la vaseline, q. s.

Paraffine et cire. — SCHULGIN emploie aussi un mélange de paraffine et de cire blanche dans les proportions de 10 à 1 ; nous ne savons pas si cette formule a été publiée.

BRASS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 301) recommande de prendre pour 100 parties de paraffine 4 à 6 parties de cire blanche. (Pour le nettoyage des coupes, Brass emploie la benzine.)

WALSEM (*ibid.*, XI, 2, 1894, p. 216) conseille (pour les objets volumineux) l'addition de 5 p. 100 de cire jaune.

MASSES AU SAVON

277. Inclusions au savon. — Le savon offre comme masse d'inclusion des avantages qui sont dans certains cas d'une grande importance. Le savon étant soluble dans l'alcool, et contenant une proportion considérable d'eau, permet l'inclusion par infiltration d'objets qui n'ont pas été déshydratés, considération qui peut être quelquefois très importante en histologie. Les masses sont pénétrantes, elles sont parfaitement transparentes, et possèdent une consistance qui fournit de très belles coupes. Après lavage, les coupes sont dans un état avantageux pour subir le traitement par les réactifs les plus divers.

La transparence des masses au savon est d'un grand avantage pour l'orientation des objets.

Le lecteur se rappellera que toutes ces masses sont alcalines, et peuvent décolorer des tissus colorés par des teintures qui ne résistent pas aux alcalis ; pour la même raison, les lavages doivent être très soigneusement faits, autrement la conservation des tissus sera compromise. Mais c'est vraisemblablement surtout parce que le savon se prête moins bien que la paraffine à la confection rapide de séries ininterrompues de coupes qu'il a cédé le pas à la paraffine.

278. Savon ordinaire à l'alcool (KADYI, *Zool. Anzeig.*, 1879, p. 477). — On prend du savon blanc ordinaire du commerce (savon au stéarate de soude, savon animal). On le râpe ; et l'on en fait dissoudre 25 grammes dans 100 cc. d'alcool à 96°, en chauffant dans une cornue au bain-marie. On filtre, si cela paraît nécessaire. Si maintenant on verse dans un verre de montre un peu de la solution, celle-ci se prendra immédiatement en une masse *blanche*. Cela indique que la solution ne contient pas assez d'eau ; on en ajoute par petites quantités, et après chaque addition on étudie l'effet produit, en versant une goutte de la solution dans un verre de montre. On verra la masse devenir de plus en plus transparente jusqu'à ce que, enfin, elle ne montre plus qu'une faible opalescence bleuâtre. La préparation est alors terminée.

Il n'est pas possible d'indiquer d'avance la quantité précise d'eau qu'il faut ajouter, puisque cela dépend naturellement de la proportion d'eau déjà contenue dans l'échantillon de savon employé. Nous pouvons dire que pour 120 grammes de solution de savon il faudra le plus souvent 5 à 10 grammes d'eau.

Digitized by Google

Il faut ajouter l'eau avec une grande prudence; car, si l'on en ajoute trop, la masse se solidifiera lentement ou même pas du tout. C'est lorsque la masse contient le minimum d'eau nécessaire pour la rendre transparente qu'elle possède le plus de fermeté et d'élasticité.

Outre la masse dont nous avons indiqué approximativement la composition, on peut en préparer qui contiennent 10, 20, 30, 40 p. 100, ou plus ou moins, de savon. WEISKER s'est servi avec avantage d'une masse contenant des parties égales de savon et d'alcool. Une telle masse est transparente, mais jaune et huileuse, et se solidifie très lentement. Après refroidissement elle se montre cependant très ferme. Son point de fusion est assez élevé, et elle est moins pénétrante que les masses plus alcooliques. Elle rend des services pour les objets très durs, et surtout pour les structures chitineuses.

Kadyi coupe avec un rasoir mouillé d'alcool fort, ce qui a l'avantage de maintenir la lame toujours propre. Pour éloigner la masse des coupes, il les met dans de l'alcool à 96 p. 100 qui, à chaud, dissout la masse immédiatement et, à froid, après un certain temps.

279. Savon à la glycérine (POELZAM, *Morph. Jahrb.*, 1877, p. 558; nous citons d'après SALENSKY). — On prend du savon blanc ordinaire et on le coupe en tranches minces qu'on expose au soleil jusqu'à ce qu'elles deviennent blanches. On les réduit alors en poudre et l'on ajoute de l'alcool de manière à faire une bouillie épaisse. A cette bouillie on ajoute de l'alcool et de la glycérine en des proportions telles que le mélange contienne, pour 10 parties de savon, 22 parties de glycérine et 35 parties d'alcool à 90 p. 100. On chauffe jusqu'à ce qu'on ait obtenu une solution parfaitement transparente, sirupeuse, un peu jaunâtre.

La masse s'emploie selon les méthodes connues. Pour la séparer des coupes, Salensky emploie l'eau ou l'alcool très dilué.

280. Autres masses au savon (FLEMMING, *Arch. f. mik. Anat.*, 1873, p. 123. — PFITZER, *Ber. deutsch. bot. Ges.*, 1887, p. 65; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 316; POLI, *Journ. de Micr.*, XIII, 1889, p. 337 (alcool à 90 p. 100, 1 partie; glycérine, 1 partie; savon à la glycérine, 1 à 2 parties). — Chauffer ensemble la glycérine et l'alcool à 60° ou 70° C., et ajouter le savon en petits morceaux.

GÉLATINE

281. — L'inclusion à la gélatine est une méthode qui offre l'avantage d'être applicable à des objets qui n'ont été déshydratés, voire même à des objets qui n'ont été traités que par des liquides aqueux. Elle peut donc rendre des services importants pour l'étude d'organismes délicats et très riches en eau, tels que plusieurs Cœlentérés. Le mode opératoire est le même que pour les autres masses liquides à chaud, si ce n'est que pour la gélatine les objets doivent être pénétrés par l'eau et non par l'alcool ou une essence. Après inclusion et refroidissement de la masse on peut quelquefois procéder immédiatement à l'opération des coupes; mais il est rare que la masse acquière sans autre traitement une consistance suffisante. Pour la durcir, on peut la traiter pendant dix à trente

Digitized by Google

minutes avec l'alcool absolu (KAISER), ou pendant quelques jours par l'alcool à 90 p. 100 suivi d'alcool absolu (KLEBS), ou par l'acide chromique (KLEBS) ; ou bien on peut la geler (SOLLAS).

La masse se sépare des coupes par le lavage à l'eau chaude.

282. Gélatine à la glycérine (KLEBS, *Arch. f. mik. Anat.*, 1869, p. 165). — Solution concentrée de colle de poisson dans l'eau, 2 parties ; glycérine, 1 partie.

283. Gélatine à la glycérine (KAISER, *Bot. Centralb.*, 1880, p. 25 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1880, p. 504). — On fait gonfler 1 partie de gélatine française pendant deux heures dans 6 parties d'eau ; on ajoute 7 parties de glycérine, et un centième du poids du mélange d'acide phénique concentré. On chauffe pendant dix à quinze minutes, en remuant le tout jusqu'à ce que les flocons produits par l'acide phénique aient disparu. On filtre à chaud à travers du verre pilé fin, humecté, et placé dans un entonnoir.

284. Gélatine à la glycérine (GERLACH, *Unters. a. d. Anat. Inst. Erlangen*, 1884 ; *Jour. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 541). — Gélatine, 40 grammes ; solution saturée d'acide arsénieux, 200 cc. ; glycérine, 120 cc. On clarifie la solution avec du blanc d'œuf. On peut la garder pendant des années dans un flacon bien bouché. Gerlach prépare ses objets pour l'inclusion par un bain de glycérine diluée (1 partie de glycérine pour 2 d'eau), dans lequel il les laisse jusqu'à ce qu'ils en soient parfaitement pénétrés. Il trouve avantageux d'ajouter un peu de thymol à la glycérine.

285. Gélatine à froid (BRUNOTTI, *Journ. de Botan.*, VI, 1892, p. 194). — On fait dissoudre à l'aide de la chaleur 20 grammes de gélatine dans 200 cc. d'eau distillée, on filtre et ajoute 1 gramme de sublimé corrosif dans 30 à 40 cc. d'acide acétique cristallisable. Cette masse possède à 15° C. la consistance d'un sirop épais. Les objets doivent être pénétrés d'abord par un mélange de 1 volume de cette masse avec 2 à 3 volumes d'eau, puis par la masse concentrée. Puis on durcit dans de l'alcool ou dans du bichromate de potasse, acide picrique, etc. On voit que ce procédé écarte entièrement l'emploi de la chaleur.

Digitized by Google

CHAPITRE XVI

COLLODION (CELLOÏDINE), GOMME, GOMME-COPAL, ETC.

286. Avantages de la méthode au collodion. — Les masses d'inclusion au collodion sont assez transparentes et offrent de grands avantages pour l'orientation des objets à couper. Le collodion a sur la paraffine l'avantage de ne pas être cristallisable, l'imbibition peut s'opérer graduellement et sans l'aide de la chaleur ; de plus, les objets, quoiqu'ils doivent être déshydratés par l'alcool absolu, n'ont pas besoin d'être traités par une essence avant l'inclusion. Il résulte de ces propriétés que le collodion est une masse éminemment favorable à la bonne conservation des structures délicates. Il a un autre avantage qui est des plus précieux pour certains cas ; on peut colorer les coupes dans les teintures histologiques ordinaires (carmin, hématoxyline, et quelques anilines, — pas toutes), *sans qu'il soit nécessaire d'enlever la masse* au préalable ; car le collodion ne se colore pas dans ces teintures, et ne s'oppose pas non plus à la coloration des tissus. De plus, on peut monter les coupes dans la glycérine ou dans le baume, *sans enlever la masse*, qui demeure parfaitement transparente et homogène, et par conséquent invisible, dans ces milieux. C'est là un avantage précieux lorsqu'il s'agit de coupes d'objets dont les parties n'ont pas de cohésion naturelle et qui se briseraient ou tomberaient en morceaux si elles n'étaient pas enrobées pendant toutes ces manipulations dans une substance protectrice. Mais la qualité la plus importante des masses au collodion est peut-être la faculté qu'elles ont d'imbiber les pièces volumineuses. Le séjour dans les solutions de collodion étant absolument inoffensif pour les éléments les plus délicats, on peut prolonger à volonté pendant des jours ou des semaines le bain nécessaire pour infiltrer les objets, et arriver ainsi à l'inclusion d'objets qui seraient littéralement

Digitized by Google

cuits si on les chauffait pendant le même temps dans un bain de paraffine.

Le défaut capital de cette méthode, c'est que les masses au collodion ne présentent pas une consistance permettant d'obtenir des coupes suffisamment fines pour plusieurs recherches d'anatomie et d'histologie ; la limite inférieure de l'épaisseur des coupes au collodion se trouve à $0^{mm},007$, tandis que celle des coupes à la paraffine se trouve à $0^{mm},001$. Nous disons bien « la limite inférieure » et nous voulons dire qu'une méthode qui ne donne que par exception des coupes d'une finesse de $0^{mm},007$ ne répond pas à tous les besoins. Un inconvénient, c'est que c'est un procédé très long. Il faut environ trois jours pour faire à la celloïdine une inclusion qui demanderait une heure à la paraffine. Il est vrai que le temps nécessaire se trouve notablement abrégé par la méthode rapide de GILSON (n° 298).

287. Collodion, Celloïdine et Photoxyline. — La très importante méthode de l'inclusion au collodion est due à M. DUVAL (*Journ. de l'Ant.*, 1879, p. 185). La « celloïdine » recommandée plus tard par MERKEL et SCHIEFFERDECKER (*Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1882, p. 200), n'est autre chose qu'un collodion pharmaceutique qui présente l'avantage d'être livré sous forme de plaques solides qui sont solubles dans un mélange à parties égales d'éther et d'alcool absolu. On peut facilement en faire venir par la poste en écrivant à WITTICK et BENKENDORF, Schering's Grüne Apotheke, 19, Chaussée-Strasse, Berlin, N. On en trouve du reste maintenant chez GRÜBLER et chez la plupart des fournisseurs de microscopie.

Dans une exposition plus récente de sa méthode (*Jour. de Micr.*, 1888, p. 197), DUVAL enseigne que la celloïdine ne possède aucun avantage réel sur le collodion. SCHIEFFERDECKER, dans un nouveau travail, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 504, déclare qu'elle lui est supérieure en bien des points. Il me semble que la celloïdine permet d'obtenir des masses plus parfaitement anhydres, et qu'elle permet de doser plus commodément la concentration des solutions. Mais pour l'un et l'autre le résultat définitif me paraît être le même.

La **photoxyline** (KRYSINSKY, *Virchow's Arch.*, CVIII, 1887, p. 217 ; BUSSE, *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, p. 47) est également un collodion breveté. C'est un produit sec. On se la procure aux mêmes sources que la celloïdine. D'après BUSSE, elle aurait l'avantage de fournir une masse qui après durcissement dans l'alcool à 85 p. 100 demeure parfaitement transparente. Mais puisque par la méthode récente d'éclaircissement avant les coupes, que nous décrivons plus loin, on obtient avec la celloïdine ou le collodion ordi-

Digitized by Google

naire des masses d'une transparence parfaite, il me semble qu'on pourra pour la plupart des travaux se passer de photoxyline.

288. Marche générale. — La marche générale diffère de celle de la méthode à la paraffine en ce que l'on ne pénètre pas par une essence avant de passer au bain d'inclusion et que la masse ne durcit pas spontanément mais demande des opérations spéciales pour lui procurer la consistance voulue. Jusqu'à ces derniers temps, on a eu l'habitude de ne procéder à l'éclaircissement qu'après la confection des coupes. Une modification récente qui me paraît être pour beaucoup d'objets un grand perfectionnement, consiste à éclaircir la masse avant de faire les coupes. Nous décrirons d'abord la marche traditionnelle telle qu'elle se pratique dans la plupart des laboratoires, et nous donnerons dans un paragraphe spécial la *méthode par éclaircissement avant les coupes*. J'ajoute que pour ma part cette dernière méthode est celle que je pratique et que je recommande.

289. Préparation des objets. — Les objets doivent être bien déshydratés par l'alcool absolu. S'ils sont de nature à se laisser facilement pénétrer, on les transportera directement dans une solution très peu épaisse de collodion, mais, s'ils sont de nature peu perméable, on les pénétrera par l'éther, ou par un mélange d'éther et d'alcool absolu.

On peut prendre un mélange de 1 volume d'éther, ou 2 ou jusqu'à 10 volumes pour 1 d'alcool absolu ; c'est un point qui n'a pas grande importance.

290. Les bains de collodion. — Le secret du succès ici c'est de pénétrer les objets d'abord par une solution peu épaisse, ensuite par une solution très épaisse. L'emploi de la celloïdine est très commode, parce qu'il permet de titrer exactement les solutions. Suivant Apathy (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1889, p. 164), il est bon d'employer la celloïdine desséchée. On débite une quantité de celloïdine en tranches minces qu'on laisse sécher à l'air jusqu'à ce qu'elles soient devenues jaunes, transparentes et d'une consistance cornée, puis on les fait dissoudre dans un mélange à parties égales d'éther et d'alcool absolu. Elschnig (*ibid.*, X, 4, 1893, p. 443) a observé que la dissolution se fait plus vite si on laisse d'abord tremper les morceaux pendant vingt-quatre heures dans la quantité nécessaire d'alcool, et qu'on ajoute l'éther ensuite. Après essai, il me semble bien qu'il en est

Digitized by Google

ainsi. L'emploi de celloïdine séchée fournit des solutions qui sont privées de l'excès d'eau qui se trouve dans la celloïdine fraîche, et donnent après durcissement une masse plus transparente et d'une consistance meilleure.

On peut appeler « peu épaisse » une solution contenant de 4 à 6 p. 100 de celloïdine séchée, et solution « épaisse » celle qui en contient de 10 à 12 p. 100. Les proportions suivantes pour trois bains successifs ont été établies par Busse (*ibid.*, IX, 1, 1892, p. 47) : — N° 1, 10 parties de celloïdine séchée, ou de photoxyline, pour 150 du mélange d'éther et alcool absolu ; n° 2, 10 parties pour 105 du mélange ; n° 3, 10 parties pour 80 du mélange.

Je n'emploie d'habitude que deux solutions, une faible, et une forte, correspondant à peu près au numéro 2 de Busse. Le numéro 3 de cet auteur est si épais que son emploi exige beaucoup de patience.

Les objets doivent rester dans le premier bain (dans un flacon ou autre récipient bien bouché) jusqu'à ce qu'ils soient parfaitement pénétrés. Il faut pour cela des jours, même pour de petits objets ; pour de gros objets, comme les embryons humains de six à douze semaines, il faut des semaines et même des mois. Lorsque l'objet est dûment pénétré par la solution faible on passe à la ou les solutions fortes. Quelques observateurs recommandent de ne pas sortir l'objet de la solution faible, mais de laisser celle-ci se concentrer graduellement par évaporation tout en ajoutant de temps à autre un peu de solution forte.

291. Inclusion définitive. — *Si l'objet est tel qu'il n'y a pas d'inconvénient à le coller directement sur un support adapté au porte-objet du microtome*, et si l'on n'a pas besoin de *manipulations spéciales* d'orientation de l'objet ni de sériation des coupes, *aucune inclusion spéciale n'est nécessaire et aussitôt que les objets sont bien pénétrés par la solution forte on peut procéder au durcissement.* Pour les objets qui pour l'un ou l'autre de ces motifs demandent une inclusion afin de les avoir enrobés *dans un bloc* de collodion, on procède comme suit.

Les objets une fois pénétrés, on peut faire l'inclusion définitive dans des boîtes de papier, selon l'une des méthodes connues décrites numéro 261. Pour ces inclusions, les boîtes en papier rondes (fig. 2, n° 261) sont particulièrement recommandables, le bouchon se prêtant de la manière la plus commode à fixer l'objet dans le microtome. Avant de faire l'inclusion dans ces boîtes, il est

Digitized by Google

bon de les préparer en y versant une goutte de collodion qu'on laisse sécher complètement. Cela a pour but d'empêcher que des bulles ne se dégagent du bouchon et ne viennent se loger dans la masse d'enrobage.

Les verres de montre profonds, des godets à couleurs humides pour aquarelle, etc., forment de bons moules à inclusion. Il faut veiller à ce qu'ils soient parfaitement secs.

Orientation. — Désire-t-on marquer la position de l'objet dans la masse pour faciliter ensuite l'orientation des lignes de coupe, on peut employer la méthode d'EYCLESHEIMER (*Amer. Nat.*, XXVI, 1892, p. 354; *Journ. Roy. Mic. Soc.* 1892, p. 563). On fait l'inclusion dans une boîte métallique pareille à celles décrites au numéro 261. Les parois tant latérales que terminales de la boîte sont percées d'une ligne de petits trous régulièrement espacés. A travers la boîte sont tendus des fils de soie qui passent dans les trous et sont assujettis sur l'extérieur de la boîte au moyen d'une goutte de celloïdine. On laisse à chacun un bout libre de 4 à 5 centimètres. On trempe ces bouts libres dans une solution peu épaisse de celloïdine mêlée de noir de fumée. On pose l'objet sur le treillis formé par les fils tendus à l'intérieur de la boîte, on remplit de collodion, et l'on durcit le tout. Après durcissement, on dissout au moyen d'une goutte d'éther le collodion qui assujettit les fils en dehors et on les tire à travers la masse. Ils laissent derrière eux une série de lignes noires servant à l'orientation.

APATHY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, I, 1888, p. 47) conseille d'arranger les objets sur une petite plaque rectangulaire de gélatine posée sur le fond du récipient. On sort cette plaque après durcissement avec le bloc à couper, et on la coupe avec lui. Les bords de la plaque forment de bonnes lignes d'orientation.

D'après une troisième méthode, qui se laisse utiliser pour les petits objets, l'inclusion se fait dans une éprouvette. Après durcissement par le chloroforme, la masse un peu rétractée se laisse extraire de l'éprouvette à l'aide d'une brusque secousse. (Voyez au paragraphe suivant.)

Il se peut que pendant ces opérations il se soit produit des bulles dans la masse. En ce cas, avant d'aller plus loin, il convient d'exposer le tout pendant une heure ou deux, jusqu'à ce que ces bulles aient disparu, à l'action des vapeurs d'éther dans un récipient bien clos. Il faut veiller à ce que la masse ne soit pas en contact avec l'éther liquide (BUSSE, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 4, 1892, p. 467).

292. Durcissement. — *a*) On procède d'habitude comme suit, par *évaporation graduelle* suivie d'un traitement par l'*alcool*.

On fait l'inclusion dans *très peu* de masse ; il est bon qu'il y en ait

Digitized by Google

juste assez pour couvrir largement l'objet. Si l'on s'est servi d'un godet de porcelaine, on le couvre avec un verre renversé, de manière à laisser à découvert un coin ou une marge de la masse pour qu'une lente évaporation puisse avoir lieu. Si ce sont des boîtes de papier, on les met sous une cloche, en faisant en sorte que celle-ci ne s'applique pas exactement sur son support. Au bout de quelques heures, le collodion s'est durci à l'extérieur et s'est un peu rétracté, de sorte que l'objet enrobé commence à être à sec. On le couvre d'une goutte de collodion, et l'on remet la préparation à couvert comme auparavant. (Si l'on a laissé trop sécher la première couche de collodion, il est bon de la mouiller avec une goutte d'éther, pour assurer que la deuxième couche adhère à la première.) Après quelques heures, on ajoute une nouvelle goutte de collodion; et l'on répète cette opération à des intervalles de quelques heures pendant deux ou trois jours, ou plus. On trouve enfin que l'objet est enrobé dans une masse d'une certaine consistance sans avoir subi de ratatinement.

Le secret de la réussite du durcissement par évaporation consiste à rendre l'évaporation *très graduelle*. Si les objets sont gros, il est bon de mettre la masse qui les contient sous une cloche fermant *hermétiquement*, et de ne soulever la cloche, pour permettre aux vapeurs d'alcool et d'éther de s'échapper, que pendant quelques secondes une ou deux fois par jour.

Nous avons souvent trouvé avantageux de durcir nos objets dans *la vapeur d'alcool*. A cet effet nous les mettons, après enrobage sur du liège ou dans les boîtes de papier, dans un flacon contenant assez d'alcool pour baigner à peine le fond de la masse.

Lorsque la masse a atteint une consistance telle que le bout du doigt (la pulpe, pas l'ongle) ne l'impressionne plus, on achève le durcissement en jetant le tout dans l'alcool. (On *peut commencer* par l'alcool, en y jetant la masse liquide, mais ce procédé donne lieu très souvent à la formation de bulles d'air.) On éloigne d'abord le papier, ou l'on sort la masse du récipient qui l'a contenue et on la porte dans une quantité considérable d'alcool (si la masse ne se laisse pas dégager au premier moment, il faut attendre qu'elle ait fait un court séjour dans l'alcool). On a employé pour le durcissement des titres d'alcool très divers. On peut maintenant regarder comme établi par les expériences *ad hoc* de Busse (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 49), que l'alcool de 85 p. 100 est celui qui convient le mieux, tant sous le rapport de la transparence de la masse définitive que sous celui de sa consistance pour les coupes. C'est du reste là

Digitized by Google

une conclusion qui se rapproche beaucoup de la pratique de la plupart des anatomistes.

Il faut de un jour à quelques semaines pour achever le durcissement.

Le *récipient contenant l'alcool ne doit pas être hermétiquement clos*, mais doit être au moins légèrement ouvert.

On voit que ce procédé est d'une longueur excessive. Je pense qu'il n'a de raison d'être que si, comme le prétendent quelques auteurs, les objets *volumineux* se durcissent mieux par cette méthode que par celles que nous allons maintenant exposer.

b) La méthode du *durcissement par le chloroforme* est due à VIALLANES (*Rech. sur l'Hist. et le Dév. des Insectes*, 1883, p. 129) ; c'est pour les petits objets la méthode la plus sûre, la plus rapide, et celle qui donne la meilleure consistance à la masse. Elle consiste à jeter les objets enrobés dans du chloroforme. Sous l'influence de ce réactif, le collodion se prend immédiatement en une masse suffisamment dure pour être coupée ; il n'y a plus qu'à attendre que l'action du chloroforme se soit propagée jusqu'au centre de la masse, ce qui a lieu en quelques heures ou en quelques jours, selon les cas. Si l'inclusion a été faite dans un tube, il n'y a qu'à verser sur le collodion une quantité suffisante de chloroforme ; après durcissement, la masse, un peu rétractée, se laisse facilement extraire du tube. Nous recommandons particulièrement ce procédé, qui donne des résultats bien meilleurs que l'alcool, pour les objets petits et moyens ; il est moins recommandable pour les objets très volumineux, parce que le durcissement trop énergique des couches extérieures de la masse fait obstacle à la diffusion nécessaire pour que le durcissement de l'intérieur se produise. Il arrive parfois que le collodion devient opaque sous l'action du chloroforme ; en ce cas, il n'y a qu'à attendre, car il s'éclaircit toujours par la suite, après un temps plus ou moins long. Il est très important d'employer du chloroforme absolu, car celui qui contient de l'eau ne produit pas la réaction voulue. En faisant usage de la méthode d'inclusion dans un tube, il convient de retirer la masse de l'éprouvette aussitôt qu'elle est suffisamment durcie pour permettre cette manœuvre, et de la mettre dans un récipient convenable avec une quantité considérable de chloroforme, jusqu'à ce qu'on ait obtenu la consistance voulue de toute la masse.

Cette méthode est incomparablement plus rapide que celle de l'alcool, et d'après mon expérience, elle donne une consistance pour le moins aussi bonne, souvent meilleure.

Digitized by Google

Depuis quelque temps je fais mes durcissements à la *vapeur de chloroforme*. Pour cela il suffit de mettre la masse liquide (après en avoir éloigné les bulles, si elle en contient, par la vapeur d'éther comme nous l'avons dit plus haut) dans un dessiccateur sur le fond duquel on a versé un peu de chloroforme. L'action est très rapide, et il me semble que la transparence de la masse se maintient mieux qu'avec le chloroforme liquide et que la consistance définitive est meilleure. Nous reviendrons sur ce sujet, numéro 297.

FLORMAN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1889, p. 184) a conseillé de renoncer à tout durcissement secondaire et d'achever le durcissement en continuant soigneusement l'évaporation graduelle de la manière décrite au commencement de ce numéro, en ayant soin de dégager la masse de son récipient et de la retourner fréquemment. Je puis constater qu'on peut arriver au but par ce moyen, mais il faut les plus grandes précautions pour éviter un ratatinement nuisible.

Une pratique récente consiste à compléter le durcissement du collodion par la *congélation*. A cet effet, on durcit d'abord la masse par l'alcool selon l'une des méthodes que nous avons décrites. Puis on la met dégorger pendant quelques heures dans l'eau, pour enlever la majeure partie de l'alcool (il n'est pas bon d'enlever l'alcool entièrement, car en ce cas la masse peut facilement acquérir par la congélation une dureté excessive). On trempe finalement la masse pendant un moment dans une solution de gomme qui sert à la faire adhérer à la platine du microtome, et l'on fait geler. A mesure qu'elles sont faites, on met les coupes dans de l'eau chaude. Si la masse est devenue d'une dureté trop grande pour fournir de bonnes coupes, on y remédie en chauffant le couteau dans de l'eau chaude.

293. Conservation des blocs. — Si l'on ne désire pas passer immédiatement à la mise en coupes, on peut conserver indéfiniment les blocs de collodion durci dans de l'alcool faible (70 p. 100). Ou bien, en les plongeant dans de la paraffine fondue (APATHY, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 1, 1888, p. 45).

Des numéros d'ordre peuvent être écrits avec un crayon tendre sur le fond des boîtes de papier servant à l'inclusion, ou avec un crayon gras sur le fond des verres de montre. Après dégagement de la masse durcie, on trouvera l'écriture imprimée sur le collodion (APATHY, *ibid.*).

294. Mise en coupes. — Le collodion formant une masse très transparente, il est quelquefois difficile d'apercevoir les contours des coupes à mesure qu'on les fait, ce qui nous prive d'un secours utile pour l'orientation de coupes de petits objets sur le porte-objet. Il est donc souvent bon d'employer pour l'inclusion du collodion teint (par exemple, par l'acide picrique dissous dans l'alcool) assez pour que les contours des coupes puissent être aperçus.

Si les objets ont été enrobés sur du liège ou sur de la moelle de

Digitized by Google

sureau, il n'y a plus qu'à adapter le tout à l'étau du microtome. Si l'on a employé des boîtes de papier ou des godets de porcelaine, il faut prendre un morceau de liège ou de moelle de sureau, ou, ce qui vaut souvent mieux, de bois tendre, et le couvrir d'une couche de collodion qu'on laisse sécher. On retire la masse contenant l'objet, on la taille de manière à obtenir une surface lisse en dessous, on mouille cette surface avec une goutte d'alcool absolu, puis avec une goutte d'éther, et on l'applique *fermement* sur le morceau de bois tendre ou de moelle de sureau, sur lequel on a préalablement déposé au moment même une nouvelle goutte de collodion *très épais*. On met le tout pendant quelques heures dans l'alcool faible pour achever la réunion des pièces ; ou bien dans le chloroforme, qui consolidera le joint beaucoup plus vite, quelquefois en peu de minutes.

M. Lindsay Johnson m'écrit qu'il trouve très commode d'employer pour cette opération un mastic fait d'environ une partie de cire avec deux parties de colophane. Il faut bien sécher le fond du bloc de collodion, chauffer légèrement le porte-objet du microtome, si possible, au-dessus d'une flamme, laisser tomber dessus quelques gouttes du mastic fondu, et appliquer le bloc de collodion. L'union est parfaite en quelques secondes.

Il est un avertissement que nous croyons devoir donner. S'il s'agit d'objets volumineux et résistants, il faut bien se garder de les fixer sur un morceau de liège et de mettre celui-ci entre les mors d'une pince de microtome. Car ce liège n'est pas un corps rigide : lorsqu'on serre la pince, il se déforme, et la masse élastique de collodion qu'il porte se déforme avec lui. Nous avons vu des embryons se courber sous l'influence de la pince à tel point que les coupes obtenues étaient de véritables calottes. Si donc on se sert d'un microtome dont le porte-objet est muni d'une pince, nous recommandons de coller les objets sur un morceau de bois tendre. Le nouveau porte-objet à cylindre mobile, du microtome Thoma, n'a pas l'inconvénient dont nous parlons, et permet d'employer le liège.

Jelinek (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 237) conseille de monter les objets sur du « stabilite », qui est un matériel de caoutchouc employé comme isolant électrique. On en trouve des blocs convenables chez Hermann Dumler, 25, Mariahilferstrasse, Vienne (VI, 1).

Les coupes se font avec le *rasoir oblique*, largement mouillé d'alcool (de 70 à 85°). Il est avantageux d'employer une disposition permettant de faire tomber automatiquement de l'alcool goutte à goutte sur la lame pendant toute la durée de l'opération des coupes. Il est

Digitized by Google

quelquefois nécessaire de couper entièrement sous l'alcool, ce qui n'est guère praticable sans le secours d'un microtome *ad hoc*, tel que celui de Gudden ou celui de Malassez.

295. Traitement des coupes. — Les coupes doivent être transportées dans l'alcool (de 70 à 85 p. 100), à mesure qu'elles sont faites. On peut ensuite les traiter par les réactifs colorants ou autres, ou les monter dans la glycérine, *sans qu'il soit nécessaire d'enlever la masse.*

Certaines couleurs d'aniline cependant colorent fortement le collodion. Si on les emploie, il faut prendre le parti d'enlever la masse ensuite.

Pour monter dans le baume, il faut quelques précautions, si l'on ne veut pas voir se dissoudre la masse, qui remplit la fonction très utile de maintenir en place les parties détachées des préparations. Il faut déshydrater avec un alcool d'un titre qui ne doit jamais être supérieur à 95°. Nikiforow (*Zeit. f. wiss Mik.*, VIII, 2, 1891, p. 189) déshydrate dans un mélange à parties égales d'alcool et de chloroforme.

Pour éclaircir ensuite les coupes, on a recommandé l'essence de bergamote, l'essence de bois de santal ou l'essence d'origan. On recommande surtout d'éviter l'essence de girofle, qui ordinairement dissout le collodion très rapidement. Il y a cependant des échantillons d'essence de girofle qui le dissolvent très lentement et peuvent être employés. L'essence d'origan donne, selon l'échantillon qu'on emploie, des résultats très divers : tantôt elle n'éclaircit pas le collodion, et tantôt elle le dissout. On recommande de prendre l'*Oleum origani Cretici*, et non l'*Ol. orig. Gallici*, mais voyez pour cette essence au chapitre des *Agents éclaircissants*.

Avec l'essence de bergamote on réussit ; mais on lui reproche de ratatiner les coupes. Minot recommande le chloroforme. L'essence de bois de cèdre a l'inconvénient d'agir très lentement, mais elle donne en définitive les meilleurs résultats pour celui qui a la patience de les attendre.

Dunham (d'après Minot, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 175) recommande particulièrement un mélange de 3 parties d'essence blanche de thym (*white oil of thyme*) avec 1 partie d'essence de girofle. Ce mélange éclaircit rapidement, et ramollit la masse juste assez pour empêcher le ratatinement qui se produit par l'emploi de l'essence de thym seule. Minot trouve que ce mélange donne de meilleurs résultats que tout autre éclaircissant, sans excepter le chloroforme.

Fish (*Amer. Mic. Soc.*, *Proceedings*, 16 *th Ann. Meeting*, 1893)

Digitized by Google

recommande un mélange d'essence rouge de thym, 1 partie, avec 3 parties d'huile de ricin (cette dernière est ajoutée en vue de la nature volatile de l'essence rouge de thym). Fish explique que l'essence rouge est le produit de la première distillation de l'essence brute, l'essence blanche étant le produit d'une deuxième distillation. L'essence rouge a une réaction neutre et se dissout facilement dans l'alcool. D'après une communication récente (écrite, dont j'ai à remercier M. Fish), on peut avec avantage substituer l'essence blanche à l'essence rouge du mélange ; cela facilite les orientations. On a recommandé l'acide phénique ; mais c'est là un réactif qui n'est pas du tout bon pour certains tissus.

Weigert (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 4, 1886, p. 480) a conseillé un mélange de 3 parties de xylol avec 1 partie d'acide phénique anhydre. Ce mélange ne doit pas être employé après des colorations aux anilines basiques, car elle les décolore. Pour celles-ci, prendre 1 partie d'huile d'aniline à la place de l'acide phénique dans le mélange.

L'aniline seule éclaircit bien, mais elle brunit les préparations si l'on n'a pas soin de l'éloigner parfaitement. On y arrive en mettant les préparations pendant vingt-quatre heures dans le chloroforme (van Gieson, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 519, revue de tous ces éclaircissants).

La créosote a été recommandée par Max Flesch.

Eyclesheimer (*ibid.*, 1892, p. 565) emploie un mélange de parties égales d'essence de bergamote, essence de cèdre et acide phénique.

296. Revue. — Dans les paragraphes précédents, nous avons exposé la marche de la méthode du collodion telle qu'elle se pratiquait habituellement jusqu'à il y a deux ou trois ans. C'est une méthode minutieuse, longue et compliquée. Après une opération longue et délicate de pénétration par le collodion, elle exige une opération longue et encore plus délicate de durcissement par évaporation suivi d'un autre durcissement par l'alcool. Puis il faut se soumettre à l'obligation de tenir les pièces constamment mouillées d'alcool pendant l'opération des coupes. Et même la manipulation subséquente des coupes exige quelques précautions spéciales. Plusieurs de ces inconvénients sont écartés par la pratique récente d'*éclaircissement avant coupes*, méthode qui me paraît certainement destinée, du moins pour bien des objets, à remplacer l'ancienne. Elle donne des masses aussi transparentes que le verre, ce qui facilite plus qu'aucune autre méthode d'inclusion l'orientation de l'objet dans le microtome. Elle donne une meilleure consistance à la masse et per-

Digitized by Google

met ainsi de réaliser des coupes beaucoup plus fines. Elle abolit l'obligation de tenir l'objet mouillé d'alcool pendant les coupes. Elle permet de conduire beaucoup plus rapidement toutes les opérations à partir de l'inclusion définitive.

297. Procédé par éclaircissement avant les coupes. — Ce procédé est dû à Bumpus (*Amer. Natural.*, XXVI, 1892, p. 80; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 438). On fait l'inclusion comme d'habitude, et l'on durcit la masse dans du chloroforme. Après durcissement, on la met dans de l'essence blanche de thym, jusqu'à ce qu'elle soit parfaitement éclaircie. On la colle avec du collodion sur un morceau de bois adapté au porte-objet du microtome, et l'on durcit le joint dans du chloroforme. On coupe avec un couteau inondé d'essence de thym.

Eyclesheimer (*op. cit.*, p. 354, ou *Journ.*, p. 563) recommande également ce procédé, le bloc de collodion étant éclairci au moyen d'acide phénique, ou de glycérine, ou du mélange cité numéro 295.

Fish (*loc. cit.*, n° 295) recommande également ce procédé. Il éclaircit dans le mélange que nous avons cité, numéro 295.

Voici comment je procède moi-même depuis quelque temps, m'inspirant de la méthode de Gilson, numéro suivant. L'inclusion se fait de la manière usuelle, et la masse est durcie pendant une heure ou plusieurs dans la *vapeur de chloroforme* (il n'y a qu'à poser le récipient contenant la masse dans un dessiccateur ou dans une *Siebdose* de Suchannek sur le fond de laquelle on a versé un peu de chloroforme). Une heure suffira bien pour de petits objets, mais on peut laisser le tout indéfiniment dans la vapeur de chloroforme. Il est bon de sortir la masse de son récipient aussitôt qu'elle est devenue suffisamment résistante pour permettre cette opération, pour qu'elle soit exposée à l'action des vapeurs sur toute sa surface. (En tout cas, il me semble que le durcissement préliminaire à la vapeur garantit une consistance meilleure que celle qu'on obtient en passant directement au mélange durcissant et éclaircissant.) Après durcissement, j'éclaircis dans le mélange de Gilson (numéro suivant), soit en général 1 partie de chloroforme pour 2 parties d'essence de cèdre. De temps à autre, j'ajoute un peu d'essence de cèdre, et je continue ainsi jusqu'à ce que le mélange ne contienne que relativement très peu de chloroforme; ou bien, aussitôt l'objet pénétré, on laisse le flacon débouché et le chloroforme se volatilise. Il n'est pas bon de prendre d'emblée de l'essence de cèdre pure, parce que dans ce cas l'éclaircissement est très lent, tandis que dans le mélange, il est rapide. Après éclaircissement,

Digitized by Google

on peut couper tout de suite, ou l'on peut conserver les blocs indéfiniment à sec dans un récipient clos. Il est souvent bon de les laisser évaporer pendant quelques heures avant de faire les coupes. *Je fais les coupes à sec.* La masse n'évaporant qu'excessivement lentement, il n'y a aucune nécessité à la couvrir d'essence pendant l'opération des coupes. J'ai eu des blocs qui sont restés pendant des semaines sur le microtome sans inconvénient. Celle-ci est la méthode que je recommande personnellement. Elle a les avantages que nous avons exposés au numéro précédent.

298. Méthode rapide de Gilson. — M. le professeur GILSON a bien voulu me communiquer le procédé suivant : déshydrater, imprégner d'éther, plonger dans du collodion ou de la celloïdine diluée, dans un tube à réaction ; faire bouillir en plongeant le tube dans un bain de paraffine fondue, jusqu'à ce que le liquide prenne la consistance sirupeuse (cette ébullition se faisant à une température très basse n'altère pas les tissus) ; monter la pièce dans ce même collodion épaissi sur un bloc ; durcir dans le chloroforme (environ une heure) ; éclaircir dans l'huile de cèdre (ou bien durcir directement dans un mélange de chloroforme et huile de cèdre) ; mettre au microtome et couper en couvrant chaque fois la pièce d'une goutte d'huile de cèdre pour faire flotter la coupe.

Il est évident que ce procédé a le grand avantage d'abréger énormément le temps nécessaire pour l'imbibition des pièces par le collodion.

299. Inclusion double dans le collodion et la paraffine. — Cette manœuvre est parfois utile pour l'inclusion d'objets dont on désire avoir des coupes très fines et qui sont trop fragiles pour donner de bons résultats par l'inclusion à la paraffine seule.

Procédé de KULTSCHIZKY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 1, 1887, p. 48). Imbiber de celloïdine (vingt-quatre heures). Puis, sans autre, mettre la pièce dans l'essence d'origan. Ensuite dans un mélange de paraffine et essence d'origan, chauffé à pas plus de 40° C. Puis mettre dans de la paraffine pure.

RYDER (*Journ. Roy. Mik. Soc.*, 1888, p. 512) recommande ce procédé, mais en substituant le chloroforme à l'essence d'origan.

Ces procédés ont le défaut de ne pas assurer une pénétration complète de l'objet par la paraffine, et en conséquence ils ne réussissent pas toujours. FIELD et MARTIN (*Bull. Soc. Zool. de France*, 1894, t. XIX, p. 48) ont imaginé d'obvier à cet inconvénient en faisant des inclusions *simultanées* dans la celloïdine et la paraffine. On prépare l'objet en l'imprégnant d'un mélange à parties égales d'alcool absolu et toluène. On fait une solution (de la consistance d'essence de girofle) de celloïdine sèche dans le même mélange d'alcool et toluène. On sature cette solution de paraffine, ajoutée en

Digitized by Google

copeaux à une température qui ne doit pas dépasser 20 à 23° C. On pénètre l'objet de cette solution (la pénétration est plus rapide que dans la celloïdine usuelle). On durcit la masse en la jetant dans une solution saturée de paraffine dans du chloroforme, et finalement on fait l'inclusion dans de la paraffine pure de la manière ordinaire. Ou bien, on durcit dans une solution de paraffine dans du toluène, et l'on procède comme précédemment. Les coupes se font comme pour la paraffine seule.

AUTRES MASSES LIQUIDES A FROID ET SOLIDIFIABLES PAR ÉVAPORATION

300. L'inclusion à la gomme offre quelques avantages qui sont, dans certains cas, d'une grande importance. Les objets sont enrobés dans une masse transparente ; ils ne sont, en aucune façon, privés de leur eau naturelle ; et ils ne sont pas soumis à l'action de la chaleur. Pour les travaux ordinaires, les masses à la gomme ne sauraient certes pas entrer en concurrence avec la paraffine et le collodion ; mais, pour des tissus très délicats et en même temps très riches en eau, comme le sont ceux des Cœlentérés, elles peuvent rendre de grands services.

301. Gomme simple (STRICKER, *Handb. d. Gewebelehre*, p. XXIV). — On fait infiltrer les objets avec une solution concentrée de gomme arabique ; puis on fait l'inclusion, dans une boîte de papier, et l'on met le tout, pour durcir la masse, pendant quelques jours dans l'alcool. J'ai vu faire de cette manière des masses excellentes.

302. Gomme glycérique (JOLIET, *Arch. de Zool. exp. et gén.*, t. X, 1882, p. XLIII du n° 3). — On fait une solution de gomme arabique pure, ayant la consistance d'un sirop épais. Ou bien, on se sert des solutions de gomme qu'on trouve dans le commerce sous le nom de « colle forte blanche liquide ». Ces solutions ont l'avantage d'avoir une consistance uniforme [1]. On verse un peu de la solution dans un verre de montre, de manière à ne pas l'emplir tout à fait. Puis on ajoutte 6 à 10 gouttes de glycérine pure, qu'on mélange aussi parfaitement que possible à la gomme. On met les objets dans la masse, et on laisse sécher le tout pendant un à quatre jours. Au bout de ce temps, la gomme doit avoir pris la consistance du cartilage ; cela arrive plus ou moins rapidement, selon l'état hygrométrique de l'air. Ordinairement, la gomme est liquide tout le premier jour, pâteuse le second, cartilagineuse le troisième. On découpe alors dans la masse une lame contenant l'objet, on la retourne et on la laisse

[1] Nous sommes à peu près sûr que ces solutions contiennent de la gélatine.

Digitized by Google

sécher jusqu'à ce qu'on la trouve bonne à être coupée. Avec une étuve ou avec le secours du soleil on peut arriver à dessécher les pièces très rapidement, mais il vaut certainement mieux employer un desséchement très lent. JOLIET a toujours trouvé que c'était après avoir attendu à peu près huit jours qu'il obtenait les meilleures coupes.

Les proportions de glycérine et de gomme doivent varier, dans les limites que nous avons indiquées, avec la saison et la nature des objets. On mettra un peu moins de glycérine en hiver ou par un temps pluvieux, qu'en été ou par un temps sec. On peut imbiber les objets dans la glycérine avant de les porter dans la masse ; mais alors il faut tenir compte de la quantité de glycérine que chaque objet porte avec lui, et en mêler d'autant moins à la gomme directement.

Pour monter les coupes, JOLIET recommande de les déposer sur le porte-objet au milieu d'une goutte d'eau ; on couvre et on ajoute au bord de la lamelle une goutte de glycérine ; celle-ci ne tarde pas à pénétrer, à se substituer à l'eau qui s'évapore et à se mêler à la gomme fondue avec laquelle elle forme un excellent liquide conservateur.

303. Dextrine (ROBERTSON, *Journ. of Anat.*, XXIV, 1890, p. 230). — On mêle ensemble 5 parties de glucose, 10 de dextrine et 1 d'acide borique. On ajoute de l'eau en raison de 3 parties d'eau pour 2 du mélange et l'on fait dissoudre en chauffant à ébullition. Emploi comme pour la masse de JOLIET, ci-dessus.

304. Gomme-laque (HYATT, *Amer. Mon. Micr. Journ.*, I, 1880, p. 8 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1880, p. 520). — Les objets doivent être pénétrés d'abord par l'alcool, puis par une solution de gomme-laque dans l'alcool. Prendre un cylindre de bois tendre, le fendre en long, pratiquer dans les moitiés une cavité de la grandeur voulue pour recevoir l'objet, l'y placer avec une grande quantité de solution épaisse de gomme-laque, remettre les moitiés du cylindre en place et les ficeler. Après un jour ou deux, la gomme-laque s'est durcie. Pour faire les coupes, on trempe le cylindre dans de l'eau chaude et l'on fait des coupes à travers le tout. Si, à l'examen des coupes, on trouve la gomme-opaque, il est facile de l'éclaircir par l'addition d'une goutte de solution de borax.

Cette méthode a été imaginée pour permettre de faire des coupes à travers des *organes chitineux très durs*.

305. Gomme-copal (v. KOCH, *Zool. Anzeig.*, 1878, p. 36). — Triturer des fragments de gomme-copal dans un mortier avec du sable, verser du chloroforme dessus en quantité suffisante pour obtenir une solution peu épaisse, et filtrer. Les objets, déshydratés par

Digitized by Google

l'alcool, sont mis dans une capsule avec la solution de copal, qu'on évapore lentement en plaçant la capsule sur une tuile chauffée par une veilleuse. Aussitôt que la solution se laisse étirer en fils qui sont cassants après refroidissement, on enlève les objets de la capsule et on les met sécher pendant quelques jours sur la tuile. Lorsqu'ils ont acquis une dureté telle qu'ils ne se laissent plus marquer par l'ongle, on peut faire les coupes.

Pour les objets pour lesquels cette méthode fut imaginée — les Coraux — les coupes se font par *la méthode d'usure*. On fait d'abord des tranches aussi minces que possible, à l'aide d'une scie fine. On les use d'un côté sur une pierre à aiguiser de manière à obtenir une surface lisse, et on les cimente, la surface lissée en bas, sur un porte-objet, à l'aide d'une solution de copal ou de baume de Canada. On laisse sécher le porte-objet pendant quelques jours sur la tuile chauffée. Lorsque le mastic est devenu parfaitement dur, on use la surface exposée des coupes, d'abord sur une meule, puis sur une pierre fine à aiguiser, jusqu'à ce qu'elles soient suffisamment minces et polies ; on lave à l'eau et l'on monte au baume de Canada.

Cette méthode est extrêmement importante pour l'étude d'objets contenant des parties très dures et des parties molles dont on désire connaître les rapports. Imaginée pour l'étude des Coraux, on peut la mettre aussi à profit pour l'étude du tissu osseux, des dents, des coquilles calcaires, etc. Elle n'est nullement difficile à pratiquer.

306. Colophane et cire (Ehrenbaum, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 414). — Ehrenbaum recommande de faire pénétrer les objets par une masse consistant en 10 parties de colophane et 1 partie de cire. L'addition de la cire a pour but de rendre la masse moins cassante. On traite les coupes par les méthodes d'usure connues (n° 305). Lorsqu'elles sont achevées, on les traite d'abord par l'essence de térébenthine, puis par le chloroforme, pour faire disparaître les dernières traces de la masse.

307. Baume de Canada (Weil, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 2, 1888, p. 200). — Baume sec, dissous dans du chloroforme, pour plus de détails voyez *loc. cit.* ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 1042.

MÉTHODES DE CONGÉLATION ET AUTRES

308. Gomme simple. — On peut soumettre les tissus frais à la congélation sans les avoir fait pénétrer par aucune masse d'inclusion. Mais cette pratique est défectueuse parce qu'elle donne lieu à la formation de cris-

Digitized by Google

taux de glace qui déchirent les tissus. Il faut donc chercher à pénétrer les tissus avec une masse qui ne cristallise pas en se gelant.

On emploie très communément à cet effet la gomme arabique. Après imbibition, on en entoure l'objet placé sur la platine ou dans le cylindre du microtome.

309. Sirop de gomme (HAMILTON, *Journ. of Anat. and Physiol.*, 1878, p. 254). — Il paraît que la présence du sucre dans l'eau a pour effet de produire à la congélation une glace présentant, au lieu d'aiguilles, des granules qui ne nuisent pas aux tissus. Hamilton fait donc pénétrer ses objets par un sirop obtenu en faisant dissoudre deux parties de sucre blanc dans une partie d'eau. Il importe que le sirop ait cette concentration-là. Puis il les fait pénétrer par une solution de gomme, dans laquelle ils sont gelés.

310. Gomme et sirop (COLE, *Methods of Mic. Research*, p. XXXIX).

Mucilage de gomme arabique P. B.	5 parties.
Sirop officinal P. B	3 —

Mêlez, et ajoutez au mélange 1 p. 100 d'acide phénique pur.

Pour le cerveau, la moelle, la rétine, enfin tous les organes fragiles, il faut prendre 4 parties de sirop pour 5 de mucilage.

Le mucilage de gomme arabique P. B. se compose de 4 parties de gomme arabique dissoutes dans 6 parties d'eau distillée, la solution étant passée à travers de la mousseline fine.

Le sirop se fait en dissolvant 1 partie de sucre blanc dans 1 partie d'eau, et en faisant bouillir.

Après pénétration, les objets sont essuyés et entourés de solution de gomme pure, dans laquelle ils sont gelés. Cette pratique a pour but d'empêcher les coupes de s'enrouler.

311. Dextrine (WEBB, *Journ. Roy Mic. Soc.*, 1890, p. 113). Solution épaisse de dextrine dans de la solution d'acide phénique dans l'eau à 2,5 p. 100.

312. Gélatine glycérique (SOLLAS, *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1884, p. 163). — Sollas emploie une gelée à la glycérine ordinaire (voyez ci-dessus, nos 281 à 284) ; elle doit former au refroidissement une masse un peu ferme.

Les coupes obtenues après congélation sont mises rapidement sur un porte-objet : elles y adhèrent. Aussitôt qu'on a déposé sur la lame le nombre voulu de coupes, on les couvre d'une goutte de glycérine ; on ajoute un couvre-objets, on le lute, et la préparation est achevée. Avec le temps, la glycérine pénètre la gélatine des coupes ; il est facile d'en activer la pénétration en mettant la préparation dans une étuve chauffée de 20° à 30° C.

313. Gomme et gélatine (JACOBS, *Amer. Nat.*, 1885, p. 734 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 900). — Gomme arabique, 5 parties ; gomme adragante 1 partie ; gélatine, 1 partie. Faire dissoudre dans l'eau chaude q. s.

Digitized by Google

pour donner une gelée peu épaisse après refroidissement. On ajoute à l'eau employée pour faire la dissolution un sixième de glycérine.

314. Huile d'anis (KÜHNE, *Centralblatt f. Bact.*, XII, 1892, p. 28 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 706). — Pénétrer par l'huile d'anis, geler sur le microtome, couper, enlever l'huile par de l'alcool, ou bien (MOORE), monter directement dans le baume. Cette méthode sera souvent commode à cause de la facilité de congélation ; l'huile d'anis se solidifie à 10° C.

315. Blanc d'œuf (ROLLETT, *Denkschr. math. naturw. Kl. k. Acad. Wiss. Wien*, 1885 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 92). — Rollett met de petits morceaux de tissus frais dans du blanc d'œuf pris sur un œuf fraîchement pondu, les porte dans ce blanc d'œuf sur la platine d'un microtome à congélation et les y enrobe dans une nouvelle quantité de blanc d'œuf. On fait geler et on coupe. Il faut se servir d'un rasoir bien refroidi. On porte les coupes sur un porte-objet, et on les examine soit dans le blanc d'œuf, soit dans la glycérine diluée.

316. Inclusion au blanc d'œuf suivi par la coagulation par la chaleur. — Entièrement démodée, mais voyez au besoin *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 223 (RUNGE) ; *Morph. Jahrb.*, Bd. ii, 3tes Heft, 1876, p. 445 (CALBERLA) ; *Zool. Anz.*, 6 vol. i, 1878, p. 130 (SELENKA) ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 304 (THOMA) ; et BECKER, *Zur Anat. d. ges. u. kranken Linse* (RUGE).

Digitized by Google

CHAPITRE XVII

MÉTHODES POUR COLLER LES COUPES EN SÉRIES SUR LE PORTE-OBJET

317. Choix d'une méthode. — Pour les travaux ordinaires nous recommandons les procédés suivants. Pour des coupes à la paraffine déjà colorées, le collodion de SCHAELLIBAUM. Pour les coupes à la paraffine destinées à être colorées, l'albumine de MAYER, à moins que la teinture qu'on veut employer ne soit de celles qui colorent l'albumine, ou à moins que les coupes ne soient plissées ; en ces cas, une des méthodes à l'eau distillée du numéro suivant. Pour les *petites* coupes à la celloïdine, un des procédés aux vapeurs d'éther (SUMMERS). Pour les *grandes* coupes à la celloïdine, la méthode de WEIGERT. Les autres méthodes citées sont du reste toutes bonnes (quoique quelques-unes d'elles ne soient pas aussi infaillibles que le disent les auteurs).

A. — MÉTHODES POUR COUPES A LA PARAFFINE

318. La méthode à l'alcool ou à l'eau distillée. — Le *principe* de cette méthode est dû à GAULE (*Arch. f. Anat. u. Phy.*, *Phys. Abth.*, 1881, p. 156). — Mouiller la lame avec de l'alcool, et y arranger les coupes à l'aide d'un pinceau également imbibé d'alcool ; laisser évaporer l'alcool ; chauffer, de manière à faire fondre la paraffine ; poser dessus une lamelle mince ; ajouter au bord de la lamelle une goutte de xylol, puis, après un moment, une goutte de solution de baume de Canada dans le xylol.

Il faut mouiller d'alcool, et *il faut* chauffer ; l'une de ces manœuvres ne suffit pas sans l'autre.

C'est là un procédé que nous pratiquons très souvent, car il est très commode. Il va sans dire qu'il suppose une certaine adresse.

Digitized by Google

Nous recommandons de poser d'abord la lamelle et d'appuyer avec le doigt sur l'un de ses angles pendant que l'on chauffe au-dessus de la flamme d'une lampe à alcool; la paraffine fondue se ramasse sur cet angle et on l'enlève avec un papier à cigarette. On laisse le papier à cigarette en place et l'on ajoute le xylol et le baume. *Si l'on n'a que peu de coupes* à monter, ou si l'on désire seulement faire un examen préliminaire de l'objet dans une essence sans tenir à la conservation définitive des coupes, ce simple procédé suffit parfaitement.

Des modifications apportées à ce procédé par d'autres travailleurs l'ont rendu applicable au montage de *séries très étendues* de coupes.

Suchannek (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 464) a établi que les conditions suivantes sont obligatoires.

Premièrement, les lamelles doivent être absolument libres de toute trace de *graisse* à leur surface, pour que l'alcool (à 50 p. 100, ou bien l'eau distillée, qu'on peut également employer) puisse s'étaler en une couche mince et d'égale épaisseur. Secondement, les lamelles ne doivent pas être chauffées à plus de 40° C., car il importe que *l'alcool ou l'eau s'évapore lentement et que la paraffine soit seulement ramollie, pas fondue*, tant que l'évaporation n'est pas achevée. Pour ce motif, Hoyer avait déjà conseillé une évaporation lente à la température du laboratoire.

Gulland (*Journ. of Anat. and Phys.*, XXVI, 1891, p. 56; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 161) fait flotter ses coupes, pour les déplisser, sur de l'eau chaude (pas assez chaude pour faire fondre la paraffine) ou bien sur l'alcool, dans une cuvette, et de là les conduit en position sur la lamelle. On fait égoutter la lamelle et l'on évapore à une température basse comme ci-dessus (lorsque l'eau s'est entièrement évaporée, les coupes prennent un aspect sec et un peu transparent). Des coupes minces seront en général fixées en une heure; des coupes épaisses demanderont six heures ou davantage. La fixation étant jugée complète, on fait fondre la paraffine, on l'éloigne par le dissolvant qu'on voudra, et l'on peut monter ou bien passer à la coloration ou à toutes autres manipulations qu'on voudra, sans grande crainte de voir les coupes se déranger.

Il paraît cependant certain que la méthode *n'est pas infaillible*, et que les résultats dépendent plus ou moins de la nature des coupes. Ainsi Schiefferdecker (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 202) a trouvé que plus les coupes sont grandes et minces, et mieux elles adhèrent; et *vice versa*. Et M. Pringle m'écrit qu'il a trouvé que les coupes de matériel fortement fixé dans les solutions chromiques, de

Digitized by Google

manière à rendre insolubles les albuminoïdes des tissus, n'adhèrent pas bien.

M. Heidenhain (*Kern. u. Protoplasma*, 1892, p. 114) procède comme l'a indiqué Suchannek, employant de l'eau distillée et évaporant plusieurs heures à une température ne dépassant pas 35° C. Il trouve l'eau préférable à l'alcool, qui est trop mobile sur la lamelle et s'évapore trop vite. Heidenhain aussi a trouvé que le procédé est moins sûr avec du matériel chromique.

La méthode de Durham (*Quart. Journ. Mic. Sci.*, 1891, p. 116; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 293) est la même, si ce n'est qu'il emploie l'alcool à 70 p. 100 au lieu d'eau.

Wlassak (« *Les coupes du système nerveux central* » de Mercier, Paris, Rueff, 1894, p. 118) monte les coupes d'abord sur une goutte d'eau tiédie déposée sur la lamelle, puis les expose à la vapeur d'eau distillée bouillante, puis les met dans l'étuve.

319. Collodion (Schællibaum, *Arch. f. mik. Anat.*, 1883, p. 565). — On mêle ensemble une partie de collodion et, selon la consistance du collodion, 3 ou 4 parties d'essence de girofle. On étale une quantité minime de la solution claire ainsi obtenue sur le porte-objet, à l'aide d'un petit pinceau. Cela forme une couche collante sur laquelle on dépose les coupes, en les étalant et en les aplatissant un peu avec un pinceau, à mesure qu'elles sont faites. Pour les fixer, Schællibaum chauffe le porte-objet à une douce chaleur sur un bain-marie jusqu'à évaporation de l'essence de girofle, ce qui a lieu en cinq à dix minutes. Nous pouvons assurer qu'on arrive au but bien plus simplement et tout aussi sûrement en tenant le porte-objet au-dessus de la flamme d'un bec de Bunsen ou d'une lampe à alcool jusqu'à ce que la paraffine soit fondue et que l'essence de girofle se soit rassemblée en larmes entre les coupes, ce qui arrive en quelques secondes ou au plus, en une demi-minute; il est tout à fait inutile de faire évaporer l'essence. Cela fait, il est utile de faire la manipulation suivante (dont je dois la connaissance à l'obligeance de M. le professeur Korotneff). On tient le porte-objet devant les lèvres, aussi près que possible, et l'on projette l'haleine vigoureusement sur les coupes. L'essence et en même temps la paraffine fondue sont projetées en larmes de tous côtés en dehors de l'espace occupé par les coupes; on essuie avec une serviette. Par ce moyen, la majeure partie de la paraffine est enlevée du coup, ce qui facilite le travail du dissolvant à employer ensuite. De plus, les coupes se trouvant en contact plus intime avec le collodion *collent mieux*.

Digitized by Google

On traite alors les coupes par un dissolvant quelconque de la paraffine qui n'attaque pas le collodion (SCHÆLLIBAUM recommande l'essence de térébenthine ; pour notre part, nous préférons et nous recommandons le xylol). L'on monte au baume, ou bien on passe par l'alcool absolu aux alcools plus faibles et à la coloration dans une teinture alcoolique ou aqueuse.

FIELD et MARTIN (*Bull. Soc. Zool. de France*, XIX, 13 mars 1894, p. 48), ont trouvé que le xylol, le toluol, et la benzine préparent le collodion à une solution plus aisée dans l'alcool; de sorte que ces éclaircissements seraient à éviter pour les cas où l'on doit procéder à la coloration des coupes. Ces auteurs recommandent, pour ces cas, l'éther de pétrole (pétrole léger d'une densité égale à 0,650) ou le chloroforme.

Personnellement, nous ne recommandons pas la méthode de Schællibaum pour les *coupes à colorer*, parce que nous ne l'avons pas trouvée suffisamment sûre, les coupes ayant trop de tendance à se détacher dans l'alcool. Nous la recommandons pour le *matériel déjà coloré*, parce qu'elle est commode et donne des préparations très propres. Elle a le défaut de ne pas bien se prêter aux manipulations nécessaires pour aplanir des coupes plissées.

On trouvera peut-être, après la coloration, que la couche de collodion entre les coupes est devenue opaque. Cela provient de ce que l'on a employé une solution trop riche en collodion, ou bien de ce que l'on a étalé le collodion en une couche trop épaisse. On fait disparaître facilement cette opacité en déshydratant et en traitant à plusieurs reprises par l'alcool absolu et l'essence de térébenthine, puis en chauffant doucement ; ou bien, en brossant l'espace opaque avec un pinceau imbibé d'essence de girofle.

La solution de collodion peut être faite avec l'essence de lavande au lieu d'essence de girofle.

GAGE préfère préparer ses porte-objets avec une couche de collodion normal qu'il laisse sécher et dont il rend la surface collante, au moment de s'en servir, en la brossant légèrement avec un pinceau imbibé d'essence de girofle. SUMMERS (*The Microscope*, 1886, p. 66, et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 544) emploie également une couche sèche, qu'il rend collante après y avoir posé les coupes, en y déposant une goutte d'un mélange à parties égales d'alcool et d'éther, qu'on laisse évaporer. Cette méthode dispense de l'emploi de la chaleur et pourra surtout rendre des services pour les coupes à la celloïdine.

STRASSER emploie un collodion riciné, pour lequel voyez *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, I, 1887, p. 45, et VI, 2, 1889, p. 153. Pour la méthode très compliquée de cet auteur au moyen de papier gommé et collodionné, qui nécessite l'emploi d'un microtome spécial, voyez *Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 3, 1886,

Digitized by Google

p. 346, et VI, 2, 1889, p. 154, et VII, 3, 1890, p. 290, et p. 304, et IX, I, 1892, p. 8. On trouvera dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 703, un court extrait de ce dernier mémoire, avec figure du « Schnitt-Aufklebe-Mikrotom ».

GALLEMAERTS (*Bull. Soc. Belge de Micr.*, XV, 1889, p. 56) préfère employer une solution saturée de pyroxyline dans l'acétone, qu'il allonge d'alcool absolu.

320. Gomme-laque (GIESBRECHT, CALDWELL, MAYER). — Voici la méthode originelle de Giesbrecht, qui trouve encore des adhérents (*Zool. Anzeig.*, 1881, p. 484). On fait une solution pas trop forte de laque rouge dans l'alcool absolu, et on la filtre. On prend un porte-objet chauffé, et on le couvre d'une couche mince de laque à l'aide d'une baguette de verre qu'on plonge dans la solution et qu'on passe une seule fois horizontalement sur la lame. On laisse sécher cette couche.

Au moment de faire les coupes, on rend la couche de laque collante en la brossant légèrement avec un pinceau imbibé de créosote. On pose les coupes sur cette couche ; on chauffe le tout au point de fusion de la paraffine pendant un quart d'heure, ce qui fait évaporer la créosote ; on éloigne la paraffine en traitant les coupes par quelques gouttes de térébenthine, et l'on monte au baume de Canada.

Dans les *Mitth. zool. Stat. Neapel*, de la même année, il est recommandé de prendre de la laque blanche au lieu de laque rouge, et de faire la solution dans l'alcool absolu (1 partie de laque pour 10 d'alcool absolu). La laque blanche du commerce étant souvent très difficilement soluble dans l'alcool, KINGSLEY recommande de prendre de la laque rouge et de la faire blanchir en l'exposant au soleil (Voyez WHITMAN, *Methods in Microscopical Anatomy*, 1885, p. 117). MARK emploie les solutions de laque dont se servent les artistes pour fixer les dessins au fusain. Dans le même numéro des *Mittheilungen* nous trouvons encore une modification du procédé originel qui consiste à brosser la lame avant de s'en servir avec de l'essence de girofle au lieu de créosote, la lame étant légèrement chauffée.

Il faut observer que les solutions de baume de Canada employées pour monter les coupes sont capables de dissoudre la laque. Il est donc bon de poser le baume sur le verre à couvrir et de mettre celui-ci rapidement en place, de manière à assujettir les coupes au plus vite.

La méthode de CALDWELL (*Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1882, p. 336) constitue une simplification importante de ce procédé. On prépare la lame au moment de s'en servir en la brossant légèrement avec une forte solution de gomme-laque dans la créosote. Après avoir posé les coupes, on les chauffe pendant une demi-heure à une température un peu supérieure au point de fusion de la paraffine, et on les traite par la térébenthine, comme nous l'avons dit.

Ces deux méthodes ont le défaut de laisser se former des granulations dans la couche de gomme-laque. MAYER attribue la formation de ces granulations à l'emploi de la créosote ou de l'essence de girofle, et propose de les éviter en employant comme dissolvant l'acide

Digitized by Google

phénique. Voici comment il prépare la solution. On pulvérise la laque et on la chauffe avec des cristaux d'acide phénique incolore jusqu à e qu'elle soit dissoute. Il faut alors filtrer, ce qu'on peut faire en ayant soin de chauffer l'entonnoir pendant le filtrage. Si la solution est trop épaisse, on peut ajouter quelques cristaux d'acide phénique. (Voyez *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 910, et WHITMAN, *Methods in Mic. Anat.*, p. 117.)

Plus récemment, MAYER (*Intern. Monatschr. f. Anat.*, 1887. Hft 2) rappelle que l'acide phénique chaud attaque certains tissus, et propose le procédé suivant. On prépare des lamelles à la laque alcoolique selon le procédé de GIESBRECHT. On pose les coupes à sec, en les appliquant fortement sur la couche de laque, et on expose pendant une demi-minute aux vapeurs d'éther.

Ces méthodes ne permettent pas la coloration des coupes. J'ajoute pour ma part que je ne comprends pas bien en vertu de quoi les méthodes à la gomme-laque trouvent encore des fauteurs, nonobstant les procédés plus commodes et plus sûrs qui sont maintenant connus.

321. Albumine (PAUL MAYER, *Mitth. zool. Stat. Neapel*, IV, 1883, p. 521). — On prend un blanc d'œuf, on y ajoute un peu de solution de salicylate de soude, et l'on filtre. Au liquide filtré on ajoute un volume de glycérine et encore un peu de salicylate, ou un autre antiseptique.

D'après *Intern. Monatschr. f. Anat.*, 1887, Hft 2, on doit prendre 50 grammes de blanc d'œuf, 50 grammes de glycérine, et 1 gramme de salicylate de soude, les bien agiter ensemble et filtrer. Je fais observer qu'en tout cas on doit en premier lieu dissoudre le salicylate dans un peu d'eau, car il ne se dissout que difficilement dans l'albumen avec de l'eau avant d'ajouter la glycérine.

FOL (*Lehrbuch*, p. 134) prend un blanc d'œuf qu'il réduit en neige en le battant, laisse déposer, filtre rapidement à travers un filtre pneumatique, ajoute un volume de glycérine, filtre encore une fois, et ajoute un peu de camphre ou d'acide phénique. J'ai trouvé que l'acide phénique précipite beaucoup d'albumine, et je conseille de s'en tenir au salicylate jusqu'à ce qu'on ait trouvé mieux.

On étale ce fixatif en couche mince sur le porte-objet au moment de s'en servir, on pose les coupes sur la couche humide, on chauffe pendant quelques minutes au bain-marie, et l'on enlève la paraffine fondue par l'essence de térébenthine.

Je trouve préférable de chauffer au-dessus d'une flamme et de chasser la paraffine fondue au moyen d'un vigoureux souffle, comme

Digitized by Google

nous l'avons dit pour la méthode de SCHÆLLIBAUM. J'enlève la paraffine par le xylol ou le toluol. On peut l'enlever à froid si l'on veut.

FOL fait observer que dans tous les cas les coupes, colorées ou non, qui sont destinées à être montées dans le baume, doivent être soigneusement lavées dans l'alcool ; autrement, il restera dans l'albumine des traces de glycérine qui troublent les préparations par la suite.

Cette méthode est particulièrement appropriée aux séries de coupes qu'on désire traiter par les teintures. L'albumine est extraordinairement tenace, de sorte qu'on ne risque aucunement de voir les coupes se détacher. Pour la coloration, on peut employer les teintures ordinaires ou les anilines. Dans l'un et l'autre cas, si l'on fait usage d'un procédé de coloration suivie de décoloration, cette méthode offre l'avantage de faciliter beaucoup la surveillance de la décoloration ; si l'on arrête celle-ci au moment même où la couche de fixatif a perdu sa couleur, on obtient en général une coloration nucléaire parfaitement précise.

Nous avons donné, numéro 269, un procédé pour le déplissage des coupes combiné avec l'emploi de l'albumine comme fixatrice.

Dans notre expérience, la méthode de MAYER au blanc d'œuf est une méthode *absolument sûre*.

Il arrive souvent que le mélange de MAYER se trouble après quelque temps, ce que l'on a attribué au développement d'un microbe. On a dit (VOSSELER, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 457) que le mélange devenu trouble a perdu ses propriétés adhésives et doit être jeté. Dans mon expérience voici ce qui se passe. Le liquide devient laiteux, puis se trouble tout à fait, enfin se caille tout à fait, en passant à un état caséeux. Mais à aucun moment il n'a perdu ses propriétés adhésives. Tant qu'il conserve assez d'humidité pour humecter le pinceau, il colle aussi bien que le premier jour, sinon mieux.

J'ajouterai que je crois qu'il y a quelquefois avantage à allonger le mélange d'eau ; il le supporte très bien.

322. Albumine (MANN, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 486). — Du blanc d'œuf bien secoué avec 10 volumes d'eau distillée et filtré deux fois à travers le même papier. En enduire une provision de lamelles, les laisser sécher à l'abri de la poussière (elles se conserveront indéfiniment dans l'état voulu). Flotter les coupes sur de l'eau chaude (40° C.), d'après le procédé de GULLAND, dans un récipient profond. Glisser une lamelle sous les coupes, les arranger, retirer la lamelle et la poser pendant cinq minutes sur une étuve à 35° C. Xylol, alcool, etc., etc.

Des lamelles enduites d'albumine et conservées à sec avaient déjà

Digitized by Google

été employées par GAGE pour coupes au collodion (Voir *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, I, 1893, p. 77.)

323. Gomme arabique (FLŒGEL, *Zool. Anzeig.*, 1883, p. 565). — Faire une solution de 1 partie de gomme arabique dans 20 parties d'eau ; filtrer et ajouter un peu d'alcool pour prévenir le développement de moisissures. Étaler cette solution sur le porte-objet en la versant dessus et laissant égoutter les lames (il est important de n'employer que des porte-objets très soigneusement nettoyés).

Les coupes ayant été posées en ordre sur la couche collante ainsi formée, on éloigne la paraffine par une goutte de benzine, et l'on monte au baume. (D'après FLŒGEL, si les coupes ne contiennent que très peu de paraffine, il n'est pas nécessaire de les traiter par un dissolvant, la solution de baume suffisant à dissoudre l'excès de paraffine. Nous pouvons constater qu'il en est ainsi, mais nous ne recommandons pas cette pratique, qui peut donner lieu à des granulations dans les préparations.)

On peut modifier cette méthode en laissant sécher complètement la gomme sur la lame, après quoi on y pose les coupes à sec. Pour les faire adhérer, il suffit d'humecter la surface de la gomme en dirigeant l'haleine dessus.

Cette méthode est excellente pour les coupes destinées à être montées directement dans le baume, mais elle ne permet pas la coloration dans des teintures aqueuses.

WADDINGTON (*Journ. Quehett Club*, 1881, p. 199) recommande le procédé suivant pour la préparation d'une gomme arabique parfaitement pure et ne présentant pas de granulations sous le microscope. Faire une solution peu épaisse de gomme arabique dans de l'eau distillée. Filtrer. Verser le liquide filtré dans de l'alcool fort et bien agiter ; la gomme se précipite sous forme d'une masse pâteuse. Recueillir cette masse sur un filtre et la laver avec de l'alcool jusqu'à ce que l'alcool de lavage ne contienne plus d'eau. La sécher. On obtient ainsi une poudre blanche qu'il faut faire dissoudre dans l'eau distillée et filtrer deux fois. On peut alors verser la solution sur des lames porte-objets, faire égoutter et sécher ces lames, et les conserver indéfiniment, prêtes à être employées.

324. Gomme à l'alun de chrome (FRENZEL, *Arch. f. mik. Anat.*, 1885, p. 51). — Faire une solution peu épaisse de gomme arabique dans l'eau, et l'additionner de solution aqueuse d'alun de chrome. On peut mettre un excès de ce réactif sans inconvénient. Finalement, on ajoute un peu de glycérine et une trace d'alcool (*loc. cit.*, p. 142). On prépare les lames avec cette solution de la manière connue,

Digitized by Google

on y pose les coupes (il est indifférent qu'elles aient été faites par la voie sèche ou par la voie humide) et on les chauffe pendant un quart d'heure, au plus, à une température de 30 à 45° C. Cela suffit pour rendre la gomme insoluble.

Cette méthode *permet la coloration sur porte-objet.* La couche de gomme ne se colore pas dans les teintures les plus usitées; seules la safranine et la fuchsine la colorent d'une manière nuisible.

325. Mucilage de coings (Born et Wieger, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 346). — On prend du mucilage de coings ordinaire des pharmacies. A deux volumes de ce mucilage on ajoute un volume de glycérine et une trace d'acide phénique. Emploi comme pour l'albumine de Mayer.

On éloigne la paraffine fondue par une goutte d'essence de térébenthine, puis on porte la lame dans l'alcool absolu, où on la laisse une demi-heure; il est important que l'alcool soit absolu et que la lame y reste le temps indiqué. On peut alors colorer. Il est cependant nécessaire d'éviter les teintures alcalines, telles que le carmin ammoniacal et le carmin au borax, car les liquides alcalins attaquent la couche de mucilage et font détacher les coupes.

326. Autres méthodes pour coupes à la paraffine. Méthode d'Obregia, importante n° 334.

Agar-Agar (Gravis, *Bull. Soc. Belge de Micro.*, XV, 1889, p. 72). Solution d'agar-agar à 1 pour 1000 dans l'eau, à employer comme le mucilage de Born.

Gélatine (Gray, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 117). Solution de gélatine à 1 p. 100 dans l'eau, emploi compliqué.

Méthode de Walsem, au papier gélatiné (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 229). Excessivement compliqué.

B. — Méthodes pour coupes aqueuses

327. Gélatine et alun de chrome (Fol, *Lehrbuch*, p. 132). — On fait dissoudre 4 grammes de gélatine dans 20 cc. d'acide acétique cristallisable, en chauffant au bain-marie et en agitant fréquemment. A 5 cc. de la solution on ajoute 70 cc. d'alcool à 70 p. 100 et 1 à 2 cc. d'une solution d'alun de chrome à 5 p. 100 dans l'eau. On verse ce mélange sur le porte-objet à préparer. On laisse sécher à l'air, et au bout de quelques heures la couche de gélatine passe à l'état insoluble. Cependant la gélatine conserve la faculté de se gonfler un peu et de devenir collante en présence de l'eau. On plonge donc le porte-objet sous la surface de l'eau dans laquelle nagent les coupes, on fait glisser les coupes à leur place et on lève le tout avec précaution; les coupes se trouvent fixées en place.

Cette méthode s'applique soit au cas de coupes faites sous l'eau,

Digitized by Google

soit au cas de coupes faites dans des masses de gomme ou de savon ; ces masses se gonflant beaucoup en présence de l'eau, il est bon de les éloigner avant de coller les coupes, autrement les coupes se soulèvent en des plis nombreux.

On pourra la trouver utile pour les grandes coupes faites à la celloïdine.

Notons ici que la méthode d'Obregia, numéro 334, peut très bien s'appliquer aux coupes aqueuses.

328. Poli (Malpighia, II, 1888, 2, p. 3; *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 361) enduit le porte-objet de gélatine de Kaiser (n° 283) fondue, y dispose les coupes, et ajoute de la glycérine et un verre à couvrir.

329. Gutta-Percha (ou **Caoutchouc**), Frenzel et Threlfall (*Zool, Anz.*, 1883, p. 51, 301 et 423). J'ai trouvé que cette méthode élégante n'est pas sûre, car la pellicule de gutta-percha se déchire très facilement. C'est probablement pour ce motif que cette méthode est maintenant entièrement abandonnée.

C. — Méthodes pour coupes au collodion

330. Méthode à l'éther de Summers (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 523). — Outre le procédé donné numéro 319, qui est applicable aux coupes au collodion, Summers trouve que le suivant suffit parfaitement. On met les coupes pendant un instant dans de l'alcool à 95 p. 100, on les dispose sur le porte-objet et l'on verse dessus de la *vapeur* d'éther. Le collodion se ramollit et devient transparent, et l'on porte la lamelle dans de l'alcool à 80 ou même 95 p. 100. On peut colorer.

Gage (*Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 1, 1893, p. 77) trouve que si les coupes doivent être colorées il est préférable d'employer des lamelles albuminées selon le procédé indiqué n° 322 ; les coupes y adhèrent mieux.

Eyclesheimer (*Amer. Nat.*, xxvi, 1892, p. 354 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 565) procède ainsi. Les coupes sont arrangées sur le porte-objet avec assez d'alcool pour les tenir humides, pas assez pour les flotter. On les couvre d'une bande de papier fin non-glacé (toilet paper) qu'on assujettit au moyen d'un fil enroulé autour du papier et de la lamelle. Les tours du fil doivent passer *entre* les coupes, s'ils arrivent à passer au-dessus ils entravent la marche de la teinture. On peut maintenant colorer, traiter avec les liquides usuels jusqu'à l'alcool de 95 p. 100, et éclaircir dans le mélange n° 295. On

Digitized by Google

enlève l'excès d'éclaircissant avec du papier buvard, on coupe le fil, enlève le papier en le roulant, et monte au baume.

Ces procédés suffisent pour les *petites séries*. Les méthodes qui vont suivre ont trait à des séries plus étendues. Nous donnons en premier lieu celles d'Apathy comme étant relativement simples.

331. Méthode à l'essence de bergamote (Apathy, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 1887, p. 742; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 670). — Faire les coupes avec un couteau enduit de vaseline jaune et mouillé d'alcool à 95 p. 100. Flotter les coupes sur de l'essence de bergamote (elle doit être verte, doit se mêler parfaitement à l'alcool à 90 p. 100 et ne pas avoir d'odeur de térébenthine). Les coupes s'étalent sur l'essence. Avant qu'elles ne s'y enfoncent on les conduit en place sur une petite bande de papier à décalquer préalablement plongée dans l'essence. Lorsqu'on a ainsi disposé une série, on laisse égoutter le papier, on en sèche la face inférieure avec du papier buvard, on le retourne et on le presse, les coupes en bas, sur un porte-objet bien sec. Les coupes se collent au verre et l'on enlève le papier en le roulant graduellement d'un bout à l'autre. On enlève des traces d'essence qui peuvent être restées autour des coupes avec un papier à cigarette. S'il n'y a pas de coloration à faire, il n'y a plus qu'à ajouter du baume et un verre à couvrir.

Dans le cas d'objets non colorés ou très petits, il est bon d'ajouter à l'essence de bergamote un peu de solution alcoolique de safranine. Le collodion des coupes s'y colore, et rend les coupes visibles. La couleur disparaît d'elle-même après quelques jours dans le baume.

Si les coupes doivent être colorées, après enlèvement de l'essence on traite par la vapeur d'un mélange d'alcool et éther (voyez au numéro précédent).

Si la coloration doit être faite dans un liquide aqueux, il faut avoir soin en arrangeant les coupes de faire en sorte que la marge de celloïdine de chacune recouvre un peu celle de sa voisine ; alors l'éther les fond toutes par les bords en une lamelle continue. Ce feuillet se détache du verre dans les liquides aqueux, et on le traite ensuite comme une seule coupe.

332. Méthode au couteau d'Apathy (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1888, p. 168). — Le couteau est couvert de vaseline jaune et d'alcool comme dans la méthode précédente. A mesure que les coupes sont faites on les conduit à l'aide d'une aiguille ou d'un petit pinceau à un

Digitized by Google

endroit sec de la lame du couteau (c'est-à-dire un endroit où il n'y a pas trop d'alcool, mais bien de la vaseline, le tout est censé être enduit de vaseline). On les dispose en séries en cet endroit, la marge de celloïdine de chacune recouvrant celle de sa voisine. Les séries doivent être de la longueur du verre à couvrir et être disposées en un carré des dimensions de ce verre. Lorsqu'un carré est complet, on sèche les coupes en tamponnant le tout avec du papier buvard ; il n'y a pas de risque qu'elles s'attachent au papier, car elles sont retenues par la vaseline. On enduit maintenant le tout avec de la solution très épaissse de celloïdine, et l'on laisse évaporer pendant cinq minutes à l'air. Puis on enlève le couteau du microtome et on le met pour une demi-heure avec les coupes dans de l'alcool à 70 p. 100.

Si l'on désire préparer plus d'un carré de coupes à la fois, il n'y a qu'à mouiller le premier avec de l'alcool à 70 p. 100 et le laisser en place pendant qu'on prépare les autres. Le séjour dans l'alcool fait solidifier la celloïdine en un feuillet continu qu'on détache avec un scalpel et qu'on peut colorer en masse. Il est bon de le mettre immédiatement sur une lamelle, en mouiller les bords avec un mélange d'alcool et éther pour qu'il ne se détache pas, et porter le tout dans la teinture.

333. Méthode de Weigert (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 490). — Les coupes sont faites, comme d'habitude, avec un rasoir mouillé d'alcool. Il faut faire attention à ne pas avoir sur la lame assez d'alcool pour faire flotter les coupes. On ne prend pas les coupes avec un pinceau, mais avec une bandelette de papier. La bandelette de papier doit avoir environ deux fois la largeur des coupes. Elle doit être découpée dans du papier assez poreux pour s'imbiber facilement d'alcool, et en même temps assez résistant, à l'état imbibé, pour ne pas se déchirer sous l'influence d'une légère traction. Weigert recommande le « papier-closet » ; nous pensons qu'on trouvera facilement cette sorte de papier chez les pharmaciens, surtout les pharmaciens anglais (demander du « Closet-paper »). On prend par les deux bouts la bandelette de papier imbibée d'alcool, on la tend légèrement et on l'abaisse sur la coupe; la coupe y adhère et on l'enlève en faisant passer la bandelette horizontalement, ou en la levant légèrement, au delà du tranchant de la lame. On commence par poser la première coupe vers le bout du papier qu'on tient dans la main gauche ; les autres coupes trouvent leur place sur le papier en suivant de gauche à droite. Entre chaque coupe on pose la bandelette de papier, les coupes en haut, sur un fond humide préparé d'avance en mettant

Digitized by Google

dans une assiette du papier buvard, à plusieurs épaisseurs, couvert d'une feuille du même papier-closet, le tout étant saturé d'alcool. Lorsqu'on a ainsi aligné sur du papier-closet toutes les coupes qu'on désire monter, on passe à la deuxième manipulation, qui est le collodionnage de la série.

Cela se fait en deux étapes. La première consiste à poser la série sur une plaque de verre collodionné. A cet effet, on a préparé d'avance des plaques de verre en versant dessus du collodion qu'on laisse s'étaler en une couche unie, comme le font les photographes. On laisse sécher cette couche (les plaques ainsi préparées peuvent être gardées indéfiniment en provision). On prend une de ces plaques, de dimensions convenables (pour les petites séries, les porte-objets suffisent ; pour les grandes coupes, on se sert de plaques de dimensions correspondantes) ; on pose sur la surface collodionnée une des bandelettes de papier avec les coupes, les coupes en bas, et on la presse légèrement contre la plaque ; les coupes adhèrent à la surface collodionnée, et l'on peut maintenant avec un peu de précaution éloigner le papier sans les déranger. Il faut observer la précaution de ne pas coller plus d'une à deux lignes de coupes sur la même plaque de verre ; autrement les premières risqueraient de se dessécher pendant que l'on prépare les suivantes. S'il se trouve un excès d'alcool autour des coupes, on l'enlève avec du papier buvard. On passe ensuite à la deuxième phase du collodionnage. Elle consiste à verser sur les coupes du collodion qu'on laisse s'étaler en une couche unie et sécher superficiellement. Aussitôt que cette couche est sèche à la surface, on inscrit au coin de la plaque, avec un pinceau chargé de bleu de méthylène, les indications nécessaires, et l'on plonge la plaque ou bien dans la solution colorante, ou bien dans de l'alcool à 80 p. 100. Dans le liquide, les denx couches de collodion ne tardent pas à se détacher du verre en emportant les coupes. Celles-ci gardent leurs positions relatives, fermement emprisonnées entre les deux feuilles de collodion. On les colore, on les lave, on déshydrate à la manière ordinaire, si ce n'est qu'on évite naturellement pour la déshydratation l'emploi d'un alcool d'un titre supérieur à 90 à 96 p. 100. On éclaircit avec le mélange cité numéro 295, en prenant toutefois la précaution de laisser les séries soit dans l'alcool, soit dans l'éclaircissant plus longtemps qu'on n'y laisserait des coupes libres. On découpe les séries dans les longueurs voulues pendant qu'elles sont encore dans l'alcool ; on peut les poser à cet effet, pour plus de sûreté, sur une bandelette de papier-closet saturée d'alcool. On monte définitivement selon les procédés connus.

Digitized by Google

Les grands avantages de la très importante méthode que nous venons d'exposer se trouvent dans la sûreté des manipulations, et dans sa rapidité. Du moment que les coupes ont été alignées sur le papier, on traite la série entière presque comme une seule coupe.

La modification apportée à ce procédé par WINTERSTEINER (*Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 316) consiste simplement à supprimer l'alignement des coupes sur la bande de papier, et à les faire glisser directement du couteau sur la plaque de verre collodionnée. Je me permets de douter que ce soit un perfectionnement.

334. Méthode d'OBREGIA (*Neurol. Centralb.*, 1890) ; nous citons d'après GULLAND, dans *Journ. of Pathology*, Feb. 1893 ; pour de plus amples détails voyez MERCIER, *Les coupes du système nerveux central*, 1894, 133). C'est une modification assez commode de la méthode de WEIGERT. On fait un mélange de

Solution sirupeuse de sucre candi pulvérisé, dans l'eau distillée bouillante	30 cc.
Alcool absolu.	20 —
Solution sirupeuse transparente de dextrine dans l'eau distillée.	10 —

On prépare les plaques de verre avec ce mélange comme on les prépare avec le collodion dans le procédé de WEIGERT, mais seulement deux ou trois jours avant de s'en servir. On les laisse sécher lentement jusqu'à ce que la surface ne colle plus que légèrement au doigt. On fait les coupes et on les cueille sur une bande de papier comme dans le procédé de WEIGERT, ou mieux sur du papier de soie satiné. Lorsque toute la série a été cueillie, on la couche sur la plaque préparée, on enlève le papier, et l'on inonde la plaque d'une solution de celloïdine (ou de photoxyline, 3 p. 100). On pose les plaques à plat, et on laisse évaporer. Aussitôt que la pellicule de collodion a acquis une certaine consistance, on la divise en rubans avec la pointe d'un couteau ; on peut alors mettre le tout de côté, la couche de sucre retenant assez d'humidité pour prévenir le desséchement des coupes. Lorsqu'on désire achever la préparation on met le tout dans de l'eau, la pellicule de collodion se détache et on la traite comme dans la méthode de WEIGERT.

Ce qui procède a trait aux coupes au collodion. Pour les coupes à la paraffine, les opérations sont simplifiées en ce qu'on supprime l'alignement sur la bande de papier. On pose les coupes directement sur la plaque préparée, on fait fondre la paraffine, on traite par un

Digitized by Google

dissolvant de la paraffine, puis par l'alcool, et on couvre de la solution de collodion et l'on procède comme ci-dessus.

L'avantage principal du procédé d'Obregia, c'est qu'il s'applique également bien aux coupes à la celloïdine, aux coupes de matériel qui n'a pas été enrobé du tout, et aux coupes à la paraffine, tandis qu'on ne peut pas bien employer la méthode de Weigert pour ces dernières.

Digitized by Google

CHAPITRE XVIII

AGENTS ÉCLAIRCISSANTS

335. — Nous entendons ici par agents « éclaircissants » les liquides dont on se sert dans le but d'augmenter la transparence des préparations microscopiques par voie optique. Ces liquides ont toujours un indice de réfraction qui approche de celui des éléments des tissus, et c'est en s'insinuant entre ces éléments qu'ils permettent aux rayons lumineux de poursuivre leur marche à travers les tissus sans subir ces variations brusques de direction qui sont la cause de l'opacité des préparations imbibées d'un milieu dont la réfringence est très inférieure à celle des éléments de la préparation. C'est assez dire que tous les agents dont nous parlons sont des liquides fortement réfringents. En outre, on demande en général à un agent éclaircissant de remplir encore la fonction d'éloigner l'alcool dont la préparation se trouve imbibée et de faciliter la pénétration de la résine qui sert à la conservation permanente de la préparation. Ces liquides doivent donc être de nature à se mêler librement à l'alcool, et être en même temps des dissolvants du baume de Canada ou d'un autre milieu résineux employé pour la conservation. La plupart de ces liquides se trouveront donc parmi les huiles essentielles.

336. Manière d'employer les éclaircissants. — Nous avons déjà insisté à plusieurs reprises sur l'importance de la précaution qui consiste à éviter autant que possible de porter une préparation brusquement dans un liquide beaucoup plus dense que celui où elle se trouve, par exemple, de l'alcool dans l'essence de cèdre. Nous avons au numéro 6 expliqué le procédé qu'il convient d'employer pour rendre le passage d'un liquide à un autre aussi graduel que possible ;

Digitized by Google

il sera donc superflu d'y revenir. Ce procédé est celui qui convient pour tous les objets *entiers*.

Pour les coupes, les déformations par osmose ne sont guère à craindre, et l'on peut convenablement les éclaircir en inondant simplement le porte-objets de quelques gouttes d'essence qu'on fait aller et venir sur le verre.

On peut activer la pénétration des éclaircissants en les employant à chaud.

Il arrive quelquefois que l'essence se trouble pendant l'opération de l'éclaircissement. Cela est dû à une combinaison entre l'huile essentielle et l'humidité de l'air (plutôt que celle des tissus). On peut en général chasser l'opacité ainsi causée en chauffant (HATCHETT JACKSON, *Zool. Anz.*, 1889, p. 630). J'ai trouvé que ce remède ne suffit pas toujours, car dans certains états de l'air l'opacité persiste, nonobstant des chauffages répétés. C'est pour cela que je conseille d'opérer toujours les éclaircissements autant que possible dans un *récipient clos*.

337. Choix d'un éclaircissant. — Cela dépend naturellement du but que l'on se propose. Nous pensons toutefois que les éclaircissants suivants doivent se trouver sur la table de travail : *essence de cèdre*, comme éclaircissant normal pour les préparations à monter au baume, et comme milieu normal pour les dissections fines; *essence de girofle*, pour les dissections fines dans lesquelles on désire profiter de la propriété qu'a cette essence de former des gouttes très convexes, ne s'étalant pas facilement sur le verre, ou de sa propriété de rendre les tissus fragiles ; *essence de bergamote*, liquide très mobile, excellent éclaircissant, se mêlant parfaitement à l'alcool à 90 p. 100; *acide phénique*, pour les préparations qui n'ont été qu'imparfaitement déshydratées.

Les éclaircissants spéciaux de la celloïdine ont été indiqués au numéro 295.

338. Classification des éclaircissants. — D'après les recherches détaillées de STIEDA, les huiles essentielles peuvent être classées dans les deux groupes suivants, selon la rapidité plus ou moins grande avec laquelle elles effectuent l'éclaircissement des coupes :

Digitized by Google

A. Groupe dont l'essence de térébenthine est le type. *Ces essences éclaircissent sans trop de peine des coupes parfaitement déshydratées, mais n'éclaircissent pas du tout ou seulement après plusieurs heures des coupes qui ne le sont pas.*

Essence de térébenthine,
— d'absinthe,
— de baume de Copahu,
— d'écorces d'orange,
— de cubèbe,
— de fenouil,
— de fleurs de millefeuille,
— de sassafras,
— de genévrier,
— de menthe crépue,
— d'origan,
— de lavande,
— de cumin,
— de cajeput,
— d'écorce de cascarille,
— de sabine,
— de citron.

B. Groupe dont l'essence de girofle est le type. *Ces essences éclaircissent avec une très grande rapidité les coupes bien déshydratées, et un peu plus lentement et avec un peu de ratatinement celles qui ne le sont pas.*

Essence de girofle,
— de *Gaultheria*,
— de cassia,
— de cannelle,
— d'anis étoilé,
— de bergamote,
— de cardamome,
— de coriandre,
— de carvi,
— de romarin.

Nous avons à ajouter au groupe des bons éclaircissants l'essence de bois de cèdre, l'essence de bois de santal, l'acide phénique et la créosote.

Neelsen et Schiefferdecker (*Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1882, p. 206) ont examiné une série d'essences dans le but d'en trouver qui réunissent les bonnes qualités d'éclaircir rapidement des coupes sorties de l'alcool à 95 p. 100, de ne pas attaquer les teintures d'aniline, et d'éclaircir le collodion sans le dissoudre. Ils ont examiné les propriétés des essences suivantes : anis, ambre, goudron de bouleau, cajeput, *Acorus calamus*, *Cassia*, bois de cèdre, citron, aneth, thym, pin, menthe, cumin, niobe, origan, *Palmarosa*, *Mentha piperata*, *Mentha pulegium*, romarin, sassafras, nard, thuya, bois de Santal, carvi. De toutes ces essences, trois seulement remplissent ces conditions : ce sont l'essence de bois de cèdre, l'essence d'origan, l'essence de bois de santal.

Il est un autre point de vue d'après lequel nous voudrions pouvoir donner une classification détaillée des éclaircissants, c'est celui de leurs indices de réfraction. Malheureusement les données nous manquent pour cela. Nous pouvons seulement donner quelques indications vagues sur les indices de quelques-uns des plus importants de

Digitized by Google

ces liquides. L'essence de cèdre a approximativement le même indice de réfraction que le crown-glass, qui est égal à celui du baume de Canada ; l'essence de cèdre éclaircit donc les objets au même degré que le baume. L'essence de girofle a un indice notablement plus élevé, il éclaircit donc plus que le baume. L'essence de térébenthine, l'essence de bergamote et la créosote ont des indices inférieurs à celui du baume ; en conséquence elles éclaircissent beaucoup moins que les autres liquides que nous avons nommés.

339. Essence de bois de cèdre (Neelsen et Schiefferdecker, *l. c.*). — Cette essence se trouve dans le commerce (Gehe und Cie, Dresden ; Schimmel u. Comp., Leipzig ; et chez les fournisseurs de réactifs histologiques, Grübler, et autres). Le prix en varie de 18 à 25 fr. le kilo, c'est donc environ le même prix que l'essence de girofle Grübler livre par petites quantités à raison de 25 centimes par 10 grammes). Elle doit être d'un jaune clair, ou, ce qui est mieux. d'un vert d'huile d'olive fraîche. Elle se mêle facilement au baume de Canada et à l'huile de ricin. Elle s'évapore avec une extrême lenteur. Elle éclaircit facilement des tissus sortis de l'alcool à 95 p. 100 ; les coupes au collodion demandent cinq à six heures pour être éclaircies. Elle n'attaque pas les teintures aux couleurs d'aniline.

Cette essence est très pénétrante, et, comme elle se mêle facilement à la paraffine, elle constitue, ainsi que nous l'avons fait observer ailleurs, l'un des meilleurs liquides sinon *le meilleur*, *pour préparer les objets pour l'inclusion à la paraffine*. D'après notre expérience, elle est de tous les éclaircissants *le moins nuisible aux tissus ;* aussi sommes-nous maintenant entièrement de l'avis de Neelsen et de Schiefferdecker, qui estiment qu'elle est en général le meilleur de tous les éclaircissants.

Nous devons ajouter qu'il est important qu'elle soit d'une bonne qualité, et surtout nous devons mettre en garde contre les espèces incolores ; nous en avons examiné une qui en plusieurs jours, ne pénétrait absolument pas des objets parfaitement déshydratés que nous avions soumis à son action.

Je me sers toujours pour ma part d'une essence *épaissie*, telle qu'on l'emploie pour les objectifs à immersion.

340. Essence de girofle. — On sait qu'il existe dans le commerce des espèces d'essence de girofle plus ou moins foncées de couleur, et les auteurs recommandent de n'employer que les espèces les plus claires. Nous donnerons quelques explications à ce sujet. Sans doute

Digitized by Google

il y a avantage à ce qu'une bonne essence soit aussi peu colorée que possible, mais cette condition n'est pas facile à réaliser avec l'essence de girofle. Cette essence jaunit et brunit très facilement avec l'âge ; de sorte qu'en faisant choix d'un échantillon très clair, on risque fort de tomber sur un produit falsifié : ce qui arrive fréquemment. Nous conseillons au lecteur d'expérimenter avec des échantillons de diverses provenances, et de s'en tenir à celui qui lui donne les meilleurs résultats.

L'essence de girofle possède deux propriétés qu'il est important de connaître. Déposée sur une lame de verre, elle ne s'étale pas facilement, mais forme une goutte très convexe, propriété qui est souvent précieuse pour les dissections fines. Une autre propriété importante, c'est celle de rendre les tissus extrêmement cassants, propriété qu'on peut également mettre à profit pour les dissections. Si l'on désire amoindrir ces effets, on peut combiner l'essence de girofle avec de l'essence de bergamote.

L'essence fraîche dissout les couleurs d'aniline plus rapidement que la vieille.

L'essence de girofle a un indice de réfraction très élevé, elle éclaircit les objets plus que le baume. Elle dissout le collodion, ce qui fait qu'elle ne convient pas pour éclaircir les coupes d'objets inclus dans cette masse.

Cette essence conserve bien les éléments des tissus soumis à son action, et nous estimons que, somme toute, elle est, après l'essence de bois de cèdre, le meilleur éclaircissant pour le travail ordinaire.

341. Essence de cannelle. — Elle ressemble beaucoup à l'essence de girofle, mais est, en général, moins épaisse. D'après notre expérience, c'est un excellent éclaircissant et nous le recommandons particulièrement.

342. Essence de bergamote (Schiefferdecker, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1882, p. 206). — L'essence de bergamote éclaircit *rapidement* les objets sortis de l'alcool à 95 p. 100, elle éclaircit bien le collodion sans le dissoudre, *et n'attaque pas les teintures aux couleurs d'aniline*. D'après notre expérience, cette essence conserve moins bien les cellules que les essences précédentes ; nous savons cependant que quelques anatomistes sont de l'avis de Schiefferdecker, qui trouve qu'elle les conserve mieux.

C'est, croyons-nous, la moins réfringente de toutes les essences usuelles.

Suchannek (*Zeit. f. wis. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 158) dit que l'essence blanchie, incolore, n'éclaircit pas bien les préparations impar-

Digitized by Google

faitement déshydratées; tandis qu'une essence verte peut absorber jusqu'à 10 p. 100 d'eau.

VAN DER STRICHT (*Arch. de Biol.*, XII, 1892, p. 741) dit que l'essence de bergamote dissout à la longue les granulations graisseuses de certains œufs.

343. Essence d'origan (NEELSEN et SCHIEFFERDECKER, *ibid.*). — Ces auteurs ont recommandé cette essence comme ayant les mêmes propriétés que l'essence de bergamote, c'est-à-dire qu'ils ont trouvé qu'elle éclaircit les coupes au collodion sans dissoudre le collodion. Toutes les fois que nous l'avons vu employer pour cet objet, il est arrivé ou bien que les coupes ne s'éclaircissaient pas, ou bien que le collodion était attaqué. Des teintures à l'aniline sont plus ou moins attaquées par cette essence.

SQUIRE (*Methods and Formulæ*, p. 81) dit que l'essence d'origan du commerce n'est pas autre chose que l'essence blanche de thym plus ou moins falsifiée; et que le produit vendu sous le nom de *Ol. Origani Cretici* n'est vraisemblablement que l'essence de marjolaine. Voyez ce que nous avons dit au sujet de l'éclaircissement de la celloïdine par les essences d'origan et de thym au numéro 295; à consulter aussi VAN GIESON (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 4, 1887, p. 482). L'action de ces essences sur la celloïdine paraît être assez inconstante.

344. Essence de bois de santal (ID., *ibid.*). — Essence un peu épaisse, de couleur pâle, s'évaporant peu et ne changeant pas à la lumière. Elle éclaircit rapidement les objets sortis de l'alcool à 95 p. 100 et un peu plus lentement des coupes au collodion; elle n'attaque pas les teintures aux couleurs d'aniline. Les auteurs que nous citons trouvent qu'elle est un éclaircissant des plus utiles. Elle est malheureusement d'un prix un peu élevé : elle coûte plus de 60 francs le kilo.

345. Essence de térébenthine. — Cette essence très communément employée est, à notre avis, le plus mauvais des éclaircissants, car elle altère à un plus haut degré qu'aucun autre les structures délicates. Ce défaut se trouve amoindri par l'emploi d'une térébenthine épaissie qu'on obtient facilement en exposant de l'essence de térébenthine en couches minces pendant quelques jours à l'air. On verse de l'essence dans une assiette qu'on couvre légèrement, de manière à exclure la poussière, et on laisse le tout jusqu'à ce que l'essence ait acquis une consistance sirupeuse.

L'essence de térébenthine a un indice de réfraction relativement très peu élevé; elle éclaircit beaucoup moins que le baume.

346. Acide phénique et créosote. — On peut employer l'un ou l'autre de ces réactifs, qui ont une action très semblable. Il est bon de les

Digitized by Google

prendre aussi concentrés que possible. Ils éclaircissent les objets sortis de l'alcool très rapidement. Il n'est pas nécessaire de prendre les objets bien déshydratés, car ces réactifs suffisent à éclaircir, quoique plus lentement, des objets imbibés d'eau. Les éléments sont bien conservés. Nous estimons que l'acide phénique est peut-être le meilleur des éclaircissants pour des objets qui ne sont pas destinés à être montés dans le baume ; malheureusement il y a toujours danger de voir les objets éclaircis dans l'un ou l'autre de ces réactifs se ratatiner sérieusement lorsqu'on les met dans le baume.

347. Mélange de Gage (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 418). — Acide phénique cristallisé, fondu, 40 cc. ; essence de térébenthine, 60 cc.

348. Xylol, benzol, toluol, naphte, chloroforme. — Quoique ces liquides soient d'un maniement peu commode, à cause de leur grande volatilité, ils peuvent rendre des services pour éclaircir des coupes au collodion. Ils servent communément pour séparer la masse et éclaircir en même temps les coupes à la paraffine. Des trois premiers, c'est le benzol qui est le plus volatil, puis vient le toluol, et c'est le xylol qui est le moins volatil, les rapports étant comme 4 : 5 : 9 (Squire, *Methods*, p. 80). Le naphte est excellent pour enlever la paraffine de coupes destinées à être colorées; mais je conseille de ne pas l'employer pour des coupes à monter directement dans le baume, vu qu'il précipite quelquefois le baume. — Voyez aussi au numéro 319.

349. Huile d'aniline. — Cette substance est un agent éclaircissant d'une certaine importance à cause de la facilité avec laquelle elle pénètre des préparations très mal déshydratées. L'aniline ordinaire éclaircit facilement des coupes sorties de l'alcool à 70 p. 100 ; et avec de certaines précautions on peut obtenir l'éclaircissement de préparations aqueuses sans aucune intervention d'un alcool quelconque. On l'a employée à la place à la fois d'alcool et d'essence pour préparer des tissus pour le bain de paraffine. Pour la manière de procéder à cette opération, qui sera d'ailleurs fort rarement indiquée, ainsi que pour la manière de préparer une aniline absolument anhydre, voyez Suchannek, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 156.

Pour l'emploi de l'aniline comme éclaircissant de coupes au collodion, voyez au numéro 295.

Digitized by Google

CHAPITRE XIX

LIQUIDES ADDITIONNELS ET CONSERVATEURS

350. — Nous donnons dans ce chapitre la composition des divers liquides employés soit pour l'examen temporaire des préparations, soit pour leur conservation définitive. Nous commencerons par les milieux aqueux et peu réfringents, nous passerons aux liquides alcooliques et glycériques, qui contiennent moins d'eau et sont plus fortement réfringents, et nous finirons par le groupe des milieux encore plus réfringents et parfaitement anhydres représenté par les huiles essentielles et les résines.

351. Eau distillée. — Pour prévenir le développement de microbes, il est bon d'y tenir un morceau de thymol ou de camphre.

L'eau peut être quelquefois employée avec avantage pour l'examen de structures délicates qui ont été préalablement bien fixées par l'acide osmique ou chromique, ou l'un des sels des métaux lourds ; par suite de la faiblesse de son indice de réfraction, elle sert parfois mieux qu'aucun autre milieu à rendre visibles des détails de structure très fins. Mais il importe de se rappeler qu'il ne faut pas traiter par l'eau des structures délicates, à moins qu'elles n'aient été fixées comme nous l'avons dit, car elle gonfle et déforme très rapidement la plupart des éléments cellulaires.

352. Théorie des liquides indifférents. — Bien des solutions ont été imaginées dans le but de donner à l'eau une densité qui approche de celle des liquides des tissus, et par ce moyen d'éviter les violentes osmoses auxquelles est due l'action nuisible de l'eau pure. La solution normale de sel en est une. Mais l'addition de sel ne sert qu'en partie à écarter cet inconvénient. Il reste toujours une circonstance qui peut provoquer l'endosmose, c'est la différence de composition des liquides des tissus et de la solution simplement saline. La

Digitized by Google

substance des cellules est, en effet, un mélange de substances « colloïdes » et de substances « cristalloïdes » (Graham), tandis que la solution saline ne contient qu'un cristalloïde. Par suite de sa diffusibilité puissante, ce cristalloïde passe rapidement par endosmose pour rejoindre les colloïdes des cellules. Pour réduire au minimum les phénomènes osmotiques, il faut que le liquide additionnel contienne la proportion voulue de sel de cuisine ou d'un autre cristalloïde, et en outre la proportion voulue de substance colloïde. On peut y ajouter, par exemple, du blanc d'œuf, ce qui permettra d'atteindre le but. On trouvera, en effet, que tous les milieux qui se montrent excellents au point de vue de la bonne conservation des tissus frais renferment et des cristalloïdes et des colloïdes. Ainsi, l'humeur vitrée contient environ 7,8 parties de cristalloïdes (chlorure de sodium), pour 4,6 de matières colloïdes et 987 d'eau. Dans 100 parties de liquide amniotique se trouvent environ 3,8 parties de matières colloïdes (albumine), 5,8 de sel, et 3,4 d'urée. Dans le sérum du sang on trouve 8,5 parties de substances colloïdes pour 1 de substance cristalloïde (Frey).

353. Sérum. Sérum iodé. — Ce réactif fut introduit dans la technique histologique par Max Schultze (*Virchow's Archiv.*, 1864, p. 268). Nous empruntons les instructions suivantes à Ranvier (*Traité*, p. 76). Il n'y a que le sérum fabriqué avec l'eau de l'amnios des mammifères qui présente des avantages sérieux. Pour se procurer de l'eau de l'amnios, on va dans un abattoir de Paris demander des *gosselins* de veau ou de mouton (c'est le nom sous lequel est connu l'utérus gravide). Une incision comprenant la paroi utérine et les membranes donne issue à un jet de sérum que l'on recueille dans un flacon muni d'un entonnoir. Ce liquide doit être parfaitement limpide et d'un jaune citrin. On ajoute dans le flacon des paillettes d'iode. Il faut agiter tous les jours le mélange, ou retourner le flacon, pour que l'iode se mélange à toute la masse, autrement il ne se trouverait de l'iode qu'au fond du flacon, et à la partie supérieure se formeraient des vibrions et des bactéries.

Le meilleur procédé pour avoir un bon sérum consiste à le préparer dans un flacon qui ne soit pas trop grand ou qui soit très plat, de manière que le niveau du liquide ne dépasse pas 2 à 3 centimètres, et de telle façon qu'il ne puisse pas y avoir une couche considérable de sérum au-dessus de la couche plus fortement iodée du fond.

On peut aussi employer un autre procédé. Le sérum est mélangé avec une forte proportion de teinture d'iode ; il se forme un précipité d'iode ; on filtre et l'on a une solution fortement iodée. On verse tous

Digitized by Google

les deux ou trois jours un peu de cette solution fortement iodée dans le sérum ordinaire qui est ainsi préservé de la putréfaction. Il est à remarquer qu'au début l'iode se dissout très lentement dans le sérum ; mais si l'on continue son action, une partie de cet iode ne tarde pas (au bout de quinze jours à trois semaines) à se transformer en iodures ; ces iodures contribuent alors à dissoudre une nouvelle quantité d'iode, et par suite on peut avoir au bout d'un à deux mois un sérum très fortement iodé. C'est ce sérum très fortement iodé et présentant une couleur brun foncé qui est le meilleur liquide pour ioder un sérum frais.

354. Sérum artificiel de Kronecker (nous ne savons où cette formule a été publiée; nous citons d'après VOGT et YUNG ; *Traité d'Anat. comp. prat.*, p. 473).

Sel marin	6 grammes.
Soude caustique	0 gr. 06
Eau distillée	1000 grammes.

355. Sérum artificiel (FREY, *Le Microscope*, p. 131).

Blanc d'œuf	30 grammes.
Chlorure de sodium	0 gr. 4
Eau	270 grammes.
Iode, q. s. pour conserver le melange.	

D'après RANVIER (*Traité*, p. 77), c'est 1,5 gramme de teinture d'iode qu'il convient d'ajouter.

356. Sérum glycérique de Migula, voyez *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 172, ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 804.

357. Humeur aqueuse. Blanc d'œuf. — Ces simples liquides additionnels ne demandent pas d'autre préparation que d'être filtrés. On peut les ioder si on le désire. L'addition d'un morceau de camphre (FREY) suffira pour conserver le blanc d'œuf pendant un certain temps.

358. Solution physiologique de sel. Solution saline normale. — On fait dissoudre 0,75 p. 100 de chlorure de sodium dans l'eau distillée. On peut souvent ajouter avec avantage une trace d'acide osmique (CARNOY).

359. Sirop simple. — C'est un milieu très utile pour l'étude de bien des tissus à l'état frais. Une bonne formule consiste en des parties égales d'eau et de sucre blanc.

360. Sirop au chloral. — Le sirop simple a l'inconvénient de se laisser

Digitized by Google

envahir très facilement par des moisissures. Une bonne manière de parer à cet inconvénient est de dissoudre du chloral dans le sirop. Il suffit de 1 p. 100 de chloral. Mais on peut employer des doses beaucoup plus fortes; nous avons employé jusqu'à 7 p. 100 sans inconvénient.

361. Sirop phéniqué. — 1 p. 100 d'acide phénique dans du sirop simple. Nous recommandons le sirop phéniqué DÉCLAT (CHASSAING, avenue Victoria, 6, à Paris, ou chez les pharmaciens). — Ce sirop a l'avantage *de rester toujours parfaitement incolore.*

362. Acétate d'alumine (*Solution de* **Gannal**); (BEALE).

Acétate d'alumine	1 partie.
Eau	10 —

363. Acétate de potassium (MAX SCHULTZE, *Arch. f. mik. Anat.*, 1872, p. 180). — Solution concentrée dans l'eau. On en ajoute une goutte au bord du verre à couvrir sous lequel se trouve l'objet, imbibé d'eau Après vingt-quatre heures on peut procéder à la fermeture de la préparation. Ce liquide a un indice de réfraction inférieur à celui de la glycérine. On croit qu'il a pour effet de prévenir le noircissement des objets qui ont été traités par l'osmium ; mais nous ignorons jusqu'à quel point il possède en réalité cette propriété.

364. Hydrate de chloral. — Solution à 5 p. 100 dans l'eau (LAVDOWSKY, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 359) ;
Ou 2,5 p. 100 dans l'eau (BRADY, *Bristish Copepods*) ;
Ou 1 p. 100 dans l'eau (MUNSON, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1881, p. 847).

LIQUIDES MERCURIQUES

365. Liqueurs de Pacini (*Journ. de Micrographie*, 1880, p. 138). — PACINI fait observer que le bichlorure de mercure coagule et précipite les matières albuminoïdes des liquides des tissus, et que pour cette raison il convient de lui associer pour certaines préparations de l'acide acétique, et pour d'autres du chlorure de sodium. C'est d'après ce princiqe qu'ont été imaginées les liqueurs classiques de Pacini. On ne les emploie guère aujourd'hui pour le montage de préparations microscopiques, mais ils peuvent encore rendre des services pour la conservation des pièces anatomiques. Voici la composition des six liqueurs de Pacini :

N° 1. — 0,5 p. 100 sublimé corrosif dans l'eau.

Pacini ne se servait de cette solution que dans les cas où il désirait éloigner le sel ou l'acide de tissus qui avaient séjourné dans l'une des autres liqueurs.

N° 2. —	Sublimé	1 partie.
	Sel de cuisine	2 —
	Eau	200 —

Digitized by Google

D'un emploi général, mais sert spécialement pour les corpuscules sanguins des animaux à sang froid, pour le sperme, les épithéliums, les nerfs et les fibres musculaires. Cette liqueur sert aussi à fixer les Infusoires.

N° 3. — Sublimé	1	partie.
Sel de cuisine	4	—
Eau	200	—

Pour les corpuscules sanguins des animaux à sang chaud.

N° 4. — Sublimé	1	partie.
Acide acétique	2	—
Eau	300	—

C'est la meilleure de ces liqueurs sous le rapport de la conservation des noyaux, mais elle produit des gonflements dans les corps cellulaires et dans les fibres.

N° 5. — (Nous citons cette formule et la suivante d'après FREY, *le Microscope*, p. 233.)

N° 5. — Sublimé	1	partie.
Sel de cuisine	2	—
Glycérine (de 25° Baumé)	13	—
Eau	113	—

Il faut mélanger et laisser reposer pendant au moins deux mois. Après ce temps on ajoute 3 volumes d'eau et l'on filtre. Cette liqueur conserve bien tous les tissus délicats.

N° 6. — Sublimé	1	partie.
Acide acétique	2	—
Glycérine (25° Baumé)	43	—
Eau	115	—

S'emploie pour les mêmes objets que la précédente. Elle ne conserve pas les corpuscules rouges du sang.

366. Modifications des liqueurs de Pacini. — Les formules suivantes sont citées par FREY (d'après CORNIL) comme étant employées dans l'Institut Pathologique de l'Université de Berlin :

N° 1. — Sublimé	1	partie.
Sel de cuisine	2	—
Eau	100	—

Pour les tissus riches en vaisseaux des animaux à sang chaud.

N° 2. — Sublimé	1	partie.
Sel de cuisine	2	—
Eau	200	—

Pour les mêmes tissus des animaux à sang froid.

N° 3. — Sublimé	1	partie.
Sel de cuisine	2	—
Eau	300	—

Pour les globules du pus et éléments semblables.

Digitized by Google

N° 4. — Sublimé	1	partie.
Eau	300	—

Pour les corpuscules du sang.

N° 5. — Sublimé	1	partie.
Acide acétique	1	—
Eau	300	—

Pour les épithéliums et le tissu conjonctif; et pour les globules du pus, lorsqu'on désire en démontrer les noyaux.

N° 6. — Sublimé	1	partie.
Acide acétique	3	—
Eau	300	—

Pour les ligaments, muscles et nerfs.

N° 7. — Sublimé	1	partie.
Acide acétique	5	—
Eau	300	—

Pour les tissus glandulaires.

N° 8. — Sublimé	1	partie.
Acide phosphorique	1	—
Eau	30	(*sic;* nous pensons qu'il faut lire 300).

Pour les tissus cartilagineux.

367. Liqueurs de Goadby (*Mic. Dict.*, art. *Préservation*). — Personne ne se sert plus de ces liquides, et j'en supprime les formules à bon escient. La **Liqueur d'Owen** (Vogt et Yung, *Traité d'Anat. comp. pratique*, p. 19) est dans le même cas.

368. Liqueur de Gilson (Carnoy, *Biologie cellulaire*, p. 94).

Sublimé	0 gr.	15
Acide acétique (à 15 p. 100 acétique cristallisable)	2 cc.	
Glycérine	30 gr.	
Alcool à 60°	60 —	
Eau	30 —	

Nous avons placé ici cette formule à cause du bichlorure de mercure qu'elle renferme ; mais nous rappelons que, par suite de la proportion assez considérable de glycérine et d'alcool qu'elle contient cette liqueur possède une puissance de déshydratation assez marquée et qu'elle ne doit être employée qu'avec des préparations soigneusement fixées. C'est un des meilleurs liquides pour l'étude du noyau et du protoplasma en général ; son indice de réfraction est suffisamment

Digitized by Google

élevé pour éclaircir au degré convenable les cellules à protoplasma sombre et granuleux ou chargé de corps étrangers.

369. Blanc d'œuf et sublimé (GAGE, *Notes on hist. methods*, *Ithaca*, 1885-86 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 223).

Blanc d'œuf	15 cc.
Eau	200 cc.
Sublimé	0 gr. 5
Sel de cuisine	4 gr.

Mêlez, agitez, filtrez, et conservez au frais. GAGE recommande beaucoup ce mélange pour l'étude des corpuscules rouges du sang et des cellules ciliées.

AUTRES LIQUIDES

376. Liqueur de Ripart et Petit (*Brebissonia*, 1880, p. 92 ; CARNOY, *Biologie cellulaire*, p. 95).

Chlorure de cuivre	0 gr. 30
Acétate de cuivre	0 — 30
Acide acétique cristallisé	1 —
Eau camphrée (pas saturée)	75 —
Eau distillée	75 —

CARNOY trouve (*loc. cit.*, p. 127) que ce liquide est en général le meilleur de tous pour la conservation des structures du noyau et du protoplasma. Il conserve parfaitement toutes les colorations ordinaires, et même pendant longtemps celle du vert du méthyle.

371. Tanin (CARNOY, *loc. cit.*).

Tanin en poudre	0 gr. 5
Eau	100 —

372. Picro-carmin. — La solution de picro-carmin a été recommandée par RANVIER comme liquide additonnel pour les objets frais, dans la pensée qu'elle possède une action fixatrice suffisante pour conserver les formes des cellules. Carnoy trouve que des cellules y vivent souvent assez longtemps pour s'y gorger d'eau et s'y détériorer.

373. Vert de méthyle. — CARNOY recommande beaucoup la solution un peu concentrée de vert de méthyle comme liquide additionnel pour les tissus frais. En solution un peu forte, le vert de méthyle est un fixateur délicat, et conserve parfaitement pendant longtemps les structures cellulaires les plus délicates. On peut souvent lui ajouter avec avantage une trace d'acide osmique et un peu d'acide acétique.

Digitized by Google

Nous ne saurions trop insister sur l'importance de ce réactif dans les recherches délicates.

374. Liqueur de Wickersheimer. (Voyez *Zool. Anzeig.*, 1879, p. 670.) — Ce liquide paraît être parfaitement inutile en histologie.

375. Liqueurs au « vinaigre salicylique » (MEYER, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 868). — On appelle « vinaigre salicylique » une solution de 1 partie d'acide salicylique dans 100 parties d'acide pyroligneux (d'une densité de 1,04 ; il doit être d'un jaune pâle). Avec cette solution, Meyer compose les deux liqueurs suivantes :

N° 1. —	Vinaigre salicylique	1 volume.
	Glycérine allongée de 2 volumes d'eau. . .	10 —

S'emploie pour des Hydres, des Nématodes, certaines larves, et autres petits organismes.

N° 2. —	Vinaigre salicylique	1 volume.
	Glycérine allongée de 4 volumes d'eau. . .	10 —

S'emploie pour les Infusoires.

Toutes les observations que nous avons rencontrées dans la littérature histologique au sujet de ces liqueurs portent qu'elles sont vraiment excellentes.

376. Vinaigre salicylique à la gomme (NOLL, *Zool, Anzeig.*, 1883, p. 472).

Liqueur de Meyer (n° 2)	1 volume.
Liqueur de Farrant (n° 358)	1 —

Ce mélange ne se trouble jamais et ne se dessèche pas. Il réussit admirablement pour les Crustacés délicats et leurs larves ; les objets ne s'y ratatinent pas, et n'y deviennent pas trop transparents. Il réussit également bien pour des préparations durcies et colorées de Polypes, de petites Méduses et d'autres Cœlentérés.

377. Médium de Deane. (Voyez *Mic. Dict.*, art. *Préservation.*) — Ce médium nous paraît superflu.

378. Gomme arabique au chloral (HOYER, *Biol. Centralbl.*, 1882, p. 23). — On prend un flacon à large goulot, de 60 centimètres cubes de contenance environ. On le remplit aux deux tiers de gomme

Digitized by Google

arabique en fragments (pas en poudre). On achève de le remplir avec une solution (de plusieurs centièmes) d'hydrate de chloral dans l'eau à laquelle on ajoute 5 à 10 p. 100 de glycérine. Après quelques jours on obtient une solution sirupeuse que l'on filtre à travers du papier de laine. La filtration est lente, mais peut être achevée en vingt-quatre heures.

Ce liquide a l'avantage de sécher suffisamment sous le verre à couvrir pour qu'il ne soit pas nécessaire de luter les préparations. Il sert pour les tissus colorés par le carmin ou l'hématoxyline. Les éléments s'y conservent bien, et sont moins éclaircis que dans le baume. Si après quelque temps la solution se trouble, il faut la filtrer et ajouter un peu de chloral.

379. Gomme arabique à l'acétate de potasse (HOYER, *ibid.*). — Ce médium se prépare de la même manière que le précédent, sauf qu'à la place de la solution de chloral glycérinée on emploie la solution officinale d'acétate de potasse ou d'ammoniaque. Il sert plus spécialement pour les préparations colorées aux teintures d'aniline.

380. Gomme glycérinée (Médium de FARRANT : BEALE, *How to work*, etc., p. 58).

Gomme arabique	2 parties.
Glycérine	1 —
Eau.	2 —

A conserver dans un flacon bouché à l'émeri et contenant un morceau de camphre.

D'après FREY, ce médium serait composé de parties égales de gomme, de glycérine et de solution saturée d'acide arsénieux dans l'eau.

D'après le *Micrographic Dictionary*, il se compose de parties égales de gomme arabique, de glycérine et de solution d'acide arsénieux à 0,37 p. 100 dans l'eau. On doit faire dissoudre d'abord la gomme dans la solution arsénieuse, et puis ajouter la glycérine avec précaution, pour éviter la formation de bulles d'air.

381. Gomme glycérinée (LANGERHANS, *Zool Anzeig.*, 1879, p. 575).

Gomme arabique	5 parties.
Eau.	5 —

Digitized by Google

On mêle, et après vingt-quatre heures on ajoute :

Glycérine	5	parties.
Solution aqueuse d'acide phénique à 5 p. 100.	10	—

Pour conserver de petits organismes dans ce médium, on en ajoute une goutte au bord de la lamelle sous laquelle ils se trouvent ; le lendemain on en ajoute encore la quantité nécessaire pour compenser la perte par évaporation, et on lute la préparation. Il y a peu de ratatinement, et la plupart des couleurs naturelles des organismes marins se conservent bien.

382. Le Mélange d'Apàthy que nous avons donné au numéro 186 est recommandé par cet observateur comme un milieu admirable pour le montage de toute sorte de préparations. On peut aussi l'employer pour luter les préparations à la glycérine.

383. Sirop Fabre-Domergue (*La Nature*, n° 823, 9 mars 1889, supp.).

Sirop de glucose dil. à 25 du pèse-sel. . .	1000	parties.
Glycérine blanche.	100	—
Alcool méthylique	200	—
Camphre à saturation.		

Dissoudre la glucose dans l'eau chaude et ajouter les autres ingrédients. Ce mélange étant toujours acide doit être neutralisé par l'addition d'un peu de lessive de potasse ou de soude.

Ce sirop est dit conserver sans altération la plupart des pigments animaux.

384. Glucose de Brun (d'après Fabre-Domergue, *Premiers principes*, 1889, p. 123).

Eau distillée.	140	parties.
Alcool camphré	10	—
Glucose..	40	—
Glycérine	10	—

Mêlez ensemble l'eau, la glucose et la glycérine, ajoutez l'alcool et filtrez pour enlever l'excès de camphre qui se précipite. Ce sirop n'attaque pas les teintures aux couleurs d'aniline et *conserve même la coloration du vert de méthyle.*

385. Levulose. — La lévulose a été recommandée comme milieu

Digitized by Google

de conservation par BEHRENS, KOSSEL et SCHIEFFERDECKER (*Das Mikroskop.*, etc., Braunschweig, 1889). Elle ne cristallise pas, et conserve bien les colorations au carmin et aux couleurs d'aniline (l'hématoxyline s'y fane un peu). Réfraction un peu supérieure à celle de la glycérine. Se mêle à l'eau.

LIQUIDES GLYCÉRIQUES

386. Glycérine. — Les liquides glycériques étant sans contredit, après les résines, les milieux les plus importants pour l'examen et la conservation des préparations microscopiques, nous ferons bien de dire quelques mots sur l'emploi de la glycérine en général.

On emploie très souvent pour la conservation définitive des préparations histologiques la glycérine fortement allongée d'eau. Cette pratique se recommande dans bien des cas à cause de l'augmentation de visibilité de certains détails de structure très fins qu'on obtient en diminuant l'indice de réfraction de la glycérine par l'addition d'eau. Mais au point de vue de la bonne conservation des pièces on fera toujours mieux d'employer la glycérine pure, la plus dense qu'on peut se procurer.

La meilleure glycérine est celle de la maison PRICE, de Londres. Elle est neutre, plus dense qu'aucune autre glycérine que nous ayons examinée, et possède un indice de réfraction de 1,46. On en trouve facilement de petites quantités dans toutes les pharmacies anglaises.

Ce n'est pas une chose facile que de luter les préparations à la glycérine d'une façon assez solide pour assurer leur conservation définitive. La glycérine est extrêmement pénétrante et finit toujours par attaquer tous les luts à la gomme-laque ou au bitume qui ont été imaginés jusqu'ici. Il est cependant un moyen très simple de prévenir cet inconvénient. On entoure la préparation d'abord d'une bordure de gelée à la glycérine (l'une ou l'autre des gelées dont les formules vont suivre conviendra). On attend que la gelée se soit solidifiée, et l'on procède à la fermeture définitive par le lut de Bell, ou par le bitume de Judée. On fera bien de prendre la précaution recommandée par MARSH, de rendre la gélatine insoluble en la traitant, aussitôt qu'elle s'est séchée suffisamment, par du bichromate de potasse. (Voyez au chapitre des « LUTS et VERNIS ».)

Nous rappelons que la glycérine dissout le carbonate de chaux, et qu'en conséquence on ne doit pas l'employer pour la conservation d'objets calcaires.

Digitized by Google

La glycérine ne conserve pas la couleur des préparations colorées par la cochenille ou (du moins d'après notre expérience) l'hématoxyline. La conservation de la coloration délicate des teintures aux carmins alunés dans la glycérine est chose sur laquelle il ne faut pas trop compter.

387. Glycérine extra-réfringente. — Si dans certains cas il est avantageux de diminuer l'indice de réfraction de la glycérine par l'addition d'eau, dans d'autres il peut être avantageux de l'augmenter. L'indice de réfraction de la glycérine de Price est de 1,46 ; en y faisant dissoudre des substances appropriées on peut élever cet indice à la hauteur de celui du crown-glass, de manière à porter la puissance éclaircissante de la glycérine à la hauteur de celle du baume de Canada, et à permettre d'utiliser l'ouverture totale des objectifs à immersion homogène. Ainsi, avec une solution de chlorure de cadmium dans la glycérine, on peut atteindre l'indice de réfraction de 1,504 ; avec une solution saturée de sulfocarbonate de zinc dans la glycérine, on arrive à 1,501 ; avec une solution saturée d'hydrate de chloral (amorphe, de Schering) dans la glycérine, on obtient 1,510; avec l'iodate de zinc dans la glycérine, on obtient 1,560, indice qui dépasse celui du baume du Canada, qui est de 1,540. (Voyez *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1879, p. 346 ; — 1881, p. 943, et p. 366, — et 1880, p. 1031.)

Pour préparer la solution de sulfocarbonate de zinc, on prend des parties égales de cristaux de sulfocarbonate de zinc et de glycérine de Price, on les mêle ensemble, et l'on chauffe jusqu'à faire bouillir la glycérine. Au bout d'une heure la solution est faite, mais il vaut mieux continuer à chauffer pendant quelque temps, vu que, si l'on ne chauffe que le temps nécessaire pour faire dissoudre les cristaux, il y a risque de voir la solution cristalliser au refroidissement. Filtrer à chaud. En évaporant doucement la solution, ou en y faisant dissoudre encore quelques cristaux, on peut faire monter l'indice de réfraction jusqu'à 1,525. (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1880, p. 1031.)

388. Glycérines alcoolisées. — En combinant en diverses proportions la glycérine, l'eau et l'alcool, on obtient une série de liquides très utiles comme liquides additionnels pour l'étude d'objets qui demandent à ne pas être trop éclaircis et à ne subir que très graduellement l'action d'un milieu dense. Pour les employer, il convient de mettre l'objet dans une quantité suffisante du liquide qu'on choisit, le couvrir légèrement, et le laisser quelques heures ou quelques jours. Au bout de ce temps, l'alcool s'est évaporé avec une partie de l'eau et l'on peut procéder à la fermeture de la préparation, ou bien monter dans la glycérine plus forte, ou dans une gelée à la glycérine. On trouvera ces liquides très importants pour l'étude des fins détails de la structure des cellules, ainsi que pour les fines dissections d'objets très petits.

Digitized by Google

1. Liquide de Calberla.

Glycérine	1	partie.
Alcool	1	—
Eau	1	—

2. Nous recommandons pour les objets très délicats le mélange suivant. (Rappelons toutefois que la liqueur de Gilson (n° 368) vient prendre place, sous le rapport de la densité, entre ce mélange et le précédent.)

Glycérine	1	partie.
Alcool	1	—
Eau	2	—

3. Liquide de Hæntsch.

Glycérine	1	partie.
Alcool	3	—
Eau	2	—

4. Liquide de Jæger (Vogt et Yung, *Traité d'Anat. comp. prat.*, p. 16).

Glycérine	1	partie.
Alcool	1	—
Eau de mer	10	—

GLYCÉRINES GÉLATINÉES : GELÉES A LA GLYCÉRINE

389. Emploi de la glycérine gélatinée, ou gelée à la glycérine. — Nous avons déjà fait observer que la glycérine est d'un emploi peu commode et peu sûr pour les préparations permanentes, à cause de la grande facilité avec laquelle elle attaque les luts, de sorte que, malgré toutes les précautions, les préparations faites à la glycérine pure seront toujours d'une permanence problématique. On pare à cet inconvénient en combinant la glycérine avec la gélatine, de manière à former un composé qui a la consistance d'une gelée à la température normale. Pour se servir de cette gelée, on en fait fondre une petite portion sur le porte-objet à l'aide d'une lampe à alcool, on y introduit l'objet préalablement imbibé d'eau ou de glycérine [1], on pose une lamelle, et on laisse refroidir. Cela suffit

[1] Cela suffit quand on fait usage d'une gelée contenant relativement peu de gélatine. Pour les gelées fermes, riches en gélatine, on n'obtiendra de bons résultats qu'en préparant les objets dans un bain de la même gelée fondue au bain-marie.

Digitized by Google

parfaitement à la conservation des pièces ; il n'est nécessaire de luter la préparation que pour mieux assujettir la lamelle en vue d'une conservation tout à fait définitive.

Les gelées à la glycérine ont un indice de réfraction supérieur à celui de la glycérine pure.

Nous sommes d'avis que ces milieux sont d'une importance très réelle, et que l'histologiste doit toujours posséder une bonne gelée à la glycérine.

390. Gelée à la glycérine (Deanne) (Frey, *Le Microscope*, p. 231). — Faire dissoudre 30 grammes de gélatine dans 60 grammes d'eau chaude, et ajouter 120 grammes de glycérine.

391. Gelée à la glycérine (Lawrence (Davies, *Prep. and Mounting of Mic. Objects*, p. 84). — On prend une quantité voulue de gélatine qu'on laisse ramollir pendant deux ou trois heures dans l'eau, on l'exprime, et on la fait fondre. On ajoute 1,5 cc. de blanc d'œuf par 25 cc. de gélatine fondue; il faut ajouter le blanc d'œuf au moment où la gélatine est refroidie mais encore liquide. On fait bouillir, ce qui coagule le blanc d'œuf et éclaircit la gélatine. On filtre à travers de la flanelle fine, et l'on ajoute pour 25 cc. du liquide filtré 10 cc. d'un mélange de 2 parties d'eau camphrée avec une partie de glycérine.

392. Gelée à la glycérine (Beale, *How to work*, etc., p. 57). — Beale fait fondre et clarifie comme dans la formule précédente une certaine quantité de gélatine (ou colle de poisson), et la combine avec un volume égal de glycérine concentrée.

393 Gelée à la glycérine (Brandt, *Zeitschr. f. wiss. Mik.*, 1880, p. 69 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1880, p. 502). — On fait fondre de la gélatine de la manière que nous avons exposée plus haut (n° 391,) on ajoute 1,5 vol. de glycérine, et l'on filtre. A la gelée filtré on ajoute quelques gouttes d'acide phénique.

La filtration du mélange est un point d'une importance capitale. La gélatine du commerce contient toujours de la poussière et de nombreux petits fils. Le papier à filtrer ne laisse pas passer la gelée en quantité suffisante, et la flanelle ne fait qu'augmenter la quantité de fils. Brandt arrive au but à l'aide du dispositif suivant. On prend une bouteille à large goulot, et on la coupe ou on la brise en deux. Le goulot est bouché par un bouchon perforé de deux trous. Dans

Digitized by Google

l'un de ces trous on ajuste un tube de verre long de 20 cm. ; au dedans de la bouteille il doit faire un peu saillie, et au dehors il doit être courbé assez brusquement de côté et effilé en une pointe de 1,5 à 2 mm. de diamètre. Dans l'autre trou on ajuste un entonnoir, de telle façon que sa partie large se trouve dans la bouteille, et que son tube de décharge passe à travers le bouchon. On tasse du verre pilé dans le tube de décharge, on met la gelée de glycérine dans l'entonnoir, et l'on remplit d'eau chaude l'espace compris entre l'entonnoir et les parois de la bouteille. L'eau chaude s'écoule lentement par l'orifice du tube de verre, et on la remplace à mesure.

394. Gelée à la glycérine (Kaiser, *Bot. Centralbl.*, 1880, p. 25). — On laisse ramollir 1 partie de gélatine de Paris pendant deux heures dans 6 parties d'eau, et l'on ajoute 7 parties de glycérine et 1 p. 100 d'acide phénique concentré. On chauffe pendant dix à quinze minutes, en remuant tout le temps jusqu'à ce que les flocons produits par l'acide phénique aient disparu. On filtre à chaud à travers du verre pilé fin, humecté et tassé dans un entonnoir.

Nous nous sommes fait une excellente gelée d'après cette formule, en substituant cependant la colle de poisson à la gélatine. On réussira à filtrer à travers du papier en tenant l'entonnoir près d'un bon feu de cheminée.

395. Gelée à la glycérine (Seaman, *Amer. Monthl. Mic. Journ.*, 1881, p. 534). — On dissout de la colle de poisson dans l'eau de manière à avoir une gelée un peu ferme après refroidissement, on ajoute 10 p. 100 de glycérine, et un peu de solution de borax, d'acide phénique ou de camphre. On filtre à chaud à travers de la mousseline et l'on ajoute un peu d'alcool.

396. Gelée à la glycérine (Fol, *Lehrb.*, p. 138). — Fol recommande les trois gelées suivantes :

1. Faire fondre ensemble un volume de la gelée de Beale (voyez n° 392) et un demi-volume à un volume d'eau, et ajouter 2 à 5 p. 100 d'une solution d'acide salicylique, d'acide phénique, ou de camphre.

2. — Gélatine	30	parties
Eau	70	—
Glycérine	100	—
Solution alcoolique de camphre	5	—

A préparer comme la gelée de Beale, le camphre étant ajouté en dernier lieu en remuant.

Digitized by Google

3. — Gélatine	20	parties.
Eau	150	—
Glycérine	100	—
Solution alcoolique de camphre	15	—

A préparer comme la précédente.

397. Gélatine au chloral (Gilson, *in litt.*). — J'ai bien de l'obligation à M. le professeur Gilson, qui a bien voulu m'envoyer, il y a deux ans, la formule suivante d'une gelée très réfringente et en conséquence utile pour des objets de nature opaque auxquels on désire épargner les essences et le baume.

Gélatine gonflée dans l'eau pendant 12 heures, égouttée, puis fondue	1	volume.
Glycérine de Price	1	—
Hydrate de chloral cristallisé	1	—

On mélange les deux liquides, et l'on ajoute autant de cristaux de choral qu'il en faut pour faire augmenter le mélange de la moitié de son volume, et l'on chauffe jusqu'à dissolution. On peut y ajouter des matières colorantes, vert de méthyle, solutions carminées, etc.

398. Gelée de Squire (Squire, *Methods and Formulae*, p. 84). — 100 grammes de gélatine française, gonflée dans de l'eau chloroformée, égouttée et fondue dans 750 grammes de glycérine. Ajouter 400 grammes d'eau chloroformée dans laquelle on a incorporé environ 50 grammes de blanc d'œuf ; mélanger intimement, et chauffer à ébullition pendant 5 minutes. Ajouter de l'eau chloroformée pour parfaire le poids total de 1,550 grammes. Filtrer dans une étuve.

Autres milieux aqueux réfringents

399. Bi-iodure de mercure et **iodure de potassium** (Stephenson, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1882, p. 167). — On ajoute les deux sels à de l'eau jusqu'à saturation, et l'on allonge d'eau s'il y a lieu. La solution saturée a l'indice de réfraction énorme de 1,680. J'ai expérimenté avec la solution saturée et avec des solutions diluées. Les tissus s'y conservent bien, mais les préparations sont bientôt détériorées par un précipité qui se forme dans le liquide. Néanmoins, je pense qu'il est bon de connaître ce liquide, qui peut rendre des services pour des préparations temporaires par suite de ses propriétés optiques vraiment remarquables.

Digitized by Google

RÉSINES

400. Les résines et les baumes sont pour la plupart des substances solides, ou du moins d'une viscosité très grande, à la température normale. Elles consistent en un corps amorphe ou vitreux en solution dans une huile essentielle. Par distillation ou par évaporation naturelle à l'air, les résines perdent leur huile essentielle et passent à l'état solide. Selon nous, c'est toujours de ces résines ainsi privées de leur essence par évaporation spontanée ou artificielle qu'il convient de se servir pour faire les solutions qu'emploie le micrographe. Voici pourquoi. Les résines brutes, encore liquides par suite de l'huile essentielle qu'elles contiennent, renferment en outre une certaine proportion d'eau. Cette eau est nuisible sous deux rapports : elle rend plus difficile le problème de faire une solution parfaitement limpide de la résine dans un des dissolvants volatils (xylol ou chloroforme, par exemple) qu'on emploie à cette fin, pour des raisons bien motivées ; elle nuit à la bonne définition et à la bonne conservation des tissus, et surtout à la bonne conservation des pièces colorées. C'est pourquoi nous recommandons de faire toujours les solutions, soit de colophane, soit de résine damar, soit de baume, avec la substance en nature ; nous sommes d'avis qu'on obtient ainsi des solutions bien plus belles qu'en employant la substance brute. Fol (*Lehrbuch*, p. 138, 139) est d'un autre avis.

Les solutions peuvent se faire avec des menstrues volatils, telles que le xylol ou le chloroforme ; en ce cas elles sèchent rapidement. Ou bien elles peuvent se faire avec des menstrues non volatils, telles que l'essence de térébenthine ; elles sèchent alors lentement. Dans l'un et l'autre cas, aussitôt que l'évaporation du dissolvant s'est accomplie, la résine devient cassante ; elle peut perdre de son adhésion à la lamelle, qui peut se laisser détacher par un choc si elle n'est pas lutée ; elle peut se fendiller et endommager la préparation. Pour cette raison, on emploie de préférence les solutions au chloroforme ou au xylol alors qu'on désire avoir une préparation solidifiée aussi rapidement que possible, de manière à pouvoir l'utiliser pour l'étude sans délai. Les solutions faites à la térébenthine doivent être au contraire employées de préférence lorsqu'il s'agit en premier lieu d'assurer à la préparation une durée aussi longue que possible.

Au point de vue pratique je crois qu'*il n'existe pas une seule de ces solutions qui soit un milieu histologique irréprochable*. Les solutions de résine damar au xylol sont très belles et donnent pour des

Digitized by Google

détails délicats souvent une meilleure définition que le baume de Canada. Mais je crois qu'aucune de ces solutions n'est parfaitement stable. Dans la plupart de mes vieilles préparations au damar se sont développés des granules qui les ont détériorées. Il en est de même, mais à un degré moindre, du baume de Canada au xylol ou au benzol. Le baume au chloroforme se conserve bien, mais brunit beaucoup avec l'âge ; de plus, il ne conserve pas bien les couleurs d'aniline. Le baume à l'alcool de Seiler se maintient très bien, mais ne conserve pas non plus les couleurs d'aniline. Je m'en sers pour les colorations au carmin. Pour les couleurs d'aniline j'emploie maintenant la colophane à la térébenthine. Elle donne une bonne définition de détails délicats et se conserve parfaitement. M. le docteur Paul Mayer m'écrit cependant que ces sortes de solutions (c'est-à-dire à la térébenthine) ne valent rien pour les colorations à l'hématéine. Puis cette solution a un indice trop faible pour les objets qui demandent à être fortement éclaircis. Pour ceux-là j'emploie l'essence de cèdre. C'est un milieu d'une définition parfaite, et qui se conserve parfaitement. Avec le temps cette essence se solidifie suffisamment pour fixer le verre à couvrir ; ou si on le désire on peut toujours luter avec le ciment de Bell. Je ne puis donc que recommander la *colophane à la térébenthine* comme milieu général ; et si l'on désire avoir un milieu plus réfringent, alors l'*essence de cèdre* pour les couleurs d'aniline, et le *baume de Seiler* pour le carmin (je n'ai pas assez d'expérience quant à son effet sur les colorations à l'hématéine). Le *baume au xylol* est certainement un milieu *excellent* quant à la conservation des couleurs (d'après mon expérience ; Martinotti cependant dit avoir trouvé que la safranine y perd), mais j'estime qu'il n'est pas *absolument* de confiance sous le rapport de la formation de granules. (M. le docteur Mayer est aussi de cet avis, à ce qu'il a bien voulu m'écrire récemment.) On le voit bien, *nous ne possédons pas encore un milieu résineux parfaitement satisfaisant.*

401. Baume de Canada. — Ce baume se trouve en général dans le commerce à l'état liquide ; on le rencontre cependant quelquefois à l'état solide. Si on ne le trouve pas sous cette forme, nous recommandons de le faire évaporer à la chaleur douce et sèche d'une étuve jusqu'à ce qu'il devienne cassant après refroidissement. Cette précaution n'est cependant nullement indispensable.

Les dissolvants employés pour faire les solutions sont : le xylol, le benzol, le chloroforme, l'essence de térébenthine et l'alcool. Les solutions dans le xylol sont moins visqueuses que celles qui sont faites

Digitized by Google

dans les autres dissolvants, ce qui les rend beaucoup plus faciles à manier. Elles sèchent vite. Elles peuvent dissoudre sans se troubler les traces de paraffine qui peuvent rester dans les coupes. Elles ont l'avantage d'attaquer moins que les autres solutions les teintures aux couleurs d'aniline. Nous avons donné au numéro précédent une estimation de la stabilité de cette solution, que nous n'avons pas toujours trouvée parfaite, ce qui ne veut cependant nullement dire que son emploi expose à de graves inconvénients. C'est la solution qu'emploie maintenant MAYER en général (MAYER, *in litt.*). Les solutions à la benzine ressemblent beaucoup aux solutions au xylol, mais nous paraissent leur être inférieures sous les rapports que nous avons indiqués. Les solutions au chloroforme sont excellentes, mais il nous semble qu'avec ce dissolvant il est moins facile d'obtenir une solution parfaitement limpide, et que les solutions sont décidément moins commodes à manier ; elles ont surtout plus de viscosité. D'après HEYS (*Trans. Mic. Soc.*, 1865, jan., p. 19), il est avantageux de verser la solution faite au chloroforme dans des flacons hauts et étroits et de la laisser reposer au moins un mois ; par ce moyen elle se clarifie. Voyez également ce que nous avons dit au sujet de ces solutions au numéro précédent.

Les solutions à la térébenthine sont peu employées. Il paraît qu'avec ce dissolvant il n'est pas très facile d'obtenir des solutions homogènes et que lorsqu'elles sèchent, il s'y forme souvent des traînées et des bulles d'air. C'est pourquoi nous recommandons de ne pas employer le baume de Canada, mais plutôt la colophane toutes les fois qu'on désire faire usage d'une solution à la térébenthine.

SEILER (*Proc. Amer. Soc. Mic.*, 1881, p. 60) recommande de prendre du baume de Canada réduit à l'état sec par évaporation comme nous l'avons dit, de le dissoudre dans de l'alcool absolu chaud, et de filtrer à travers de la ouate. Cette solution aurait, selon Seiler, l'avantage que, comme elle nous met à même d'y porter les objets directement de l'alcool absolu sans traitement par une essence ou autre agent éclaircissant, on évite le ratatinement des tissus causé par l'emploi des agents éclaircissants, et l'on évite aussi la dissolution des parties graisseuses des cellules.

Je trouve que c'est là une opération trop délicate, et elle ne m'a pas donné de meilleurs résultats que le procédé ordinaire de passage par une essence. Mais, comme je l'ai dit plus haut, je trouve que la solution de SEILER est *une des plus stables qui existent* (la mienne, faite depuis quatorze ans, est encore parfaitement limpide, et n'a pas sensiblement foncé de couleur). Employée de la manière ordinaire,

Digitized by Google

après un éclaircissant, elle est d'une manipulation assez facile, si ce n'est qu'elle a une tendance à condenser l'haleine de l'opérateur à sa surface sous forme de petites bulles d'eau. La *définition est très belle*, et la *conservation presque toujours parfaite;* mes plus anciennes préparations ne montrent que quelques granulations sans importance. Naturellement on ne peut pas employer cette solution avec les couleurs d'aniline. A part cela, *je m'en suis parfaitement bien trouvé.*

Sahli (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 6) a préconisé une solution de baume dans l'essence de bois de cèdre.

Martinotti (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 2, 1887, p. 159) a obtenu de très belles solutions avec l'essence d'aspic. (« Essence d'aspic rectifiée, de Duroriez, à Paris.) Malheureusement la solution attaque la safranine.

402. Résine damar, ou dammar, ou d'Ammar. — On peut faire des solutions de résine damar dans le xylol, la benzine ou le chloroforme. Ces solutions sont parfaitement incolores, avantage qu'elles présentent sur les solutions de baume de Canada. Mais elles ont l'inconvénient de laisser la résine à l'état d'une grande fragilité ou même de friabilité, après évaporation du dissolvant. C'est pour cette raison, aussi bien que dans le but de diminuer l'indice de réfraction, qu'on fait les solutions, en partie du moins, à l'aide de l'essence de térébenthine.

Les solutions de damar n'ont, pensons-nous, aucun avantage sur les solutions de baume de Canada pour les travaux ordinaires d'histologie ou d'embryologie, et leur sont même inférieures sous le rapport de la durée ; mais elles présentent des avantages indiscutables lorsqu'il s'agit de la démonstration de détails de structure très fins ; c'est pour ce motif qu'on les emploie de préférence dans les recherches cytologiques.

Flemming (*Arch. f. mik. Anat.*, 1881, p. 322) fait dissoudre de la résine damar dans un mélange à parties égales de benzine et d'essence de térébenthine, à l'aide de la chaleur ; il fait évaporer ensuite la solution jusqu'à la consistance d'un sirop épais. Nous avons beaucoup employé cette solution et avons trouvé qu'elle donne d'admirables résultats quant à la définition d'objets difficiles, mais nous avons aussi toujours trouvé que nos solutions devenaient troubles après quelques mois.

« C. M. J. » (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 145) explique que le damar n'est pas parfaitement soluble dans la benzine ou dans la térébenthine à la température normale ; et que si l'on s'aide de la chaleur

Digitized by Google

pour effectuer la dissolution, on arrive à une dissolution plus complète sur le moment, mais la solution devient laiteuse avec le temps. Il conseille de procéder ainsi. A 3 parties de résine damar broyée on ajoute 6 parties de benzine pure, et on laisse la résine se dissoudre à la température normale. Après deux jours, on décante la résine dissoute et l'on ajoute une partie d'essence de térébenthine. La solution ainsi préparée se maintient indéfiniment d'une limpidité parfaite, et l'addition d'essence de térébenthine suffit pour empêcher la résine de devenir trop cassante en séchant.

Pfitzner (*Morphol. Jahrb.*, 1880, p. 469) prend des parties égales de damar, de benzine et d'essence de térébenthine, les mêle et les laisse dans un endroit chaud jusqu'à ce que la dissolution soit faite. Puis il décante et fait évaporer à la consistance voulue. Nous pensons que c'est là une meilleure méthode de préparation que celle de Flemming.

Nous ajouterons que nous avons trouvé que le damar se dissout entièrement à froid dans le xylol, et donne ainsi une solution de toute beauté en restant limpide indéfiniment; la résine devient cependant très cassante en séchant. La *définition est extrêmement belle*, mais comme je l'ai dit plus haut les préparations développent souvent avec le temps (pas toujours) des granulations qui les rendent presque inutilisables pour les travaux délicats.

Martinotti (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 2, 1887, p. 153) recommande de combiner cette solution à de l'essence de térébenthine.

On pourra lire encore d'autres formules dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 1061, et 1890, p. 680; et dans Squire, *Methods and Formulæ*, p. 84.

Je reconnais la grande beauté de la définition fournie par ces solutions, mais il me semble malheureusement qu'*aucune d'elles ne mérite une grande confiance sous le rapport de la conservation indéfinie.*

403. Colophane. — L'emploi d'une solution de colophane dans l'essence de térébenthine, préconisé par Kleinenberg, est en effet fort à recommander. La solution est incolore et limpide, et reste indéfiniment telle. Elle sèche très lentement. L'indice de réfraction est inférieur à celui du baume, et donne de très bonnes définitions des objets difficiles. Nous employons beaucoup cette solution, et comme nous avons pu nous assurer qu'elle est la plus facile de toutes à manier, nous la recommandons spécialement aux commençants.

Kleinenberg met en garde contre l'emploi de la solution de colo-

Digitized by Google

phane dans l'alcool absolu. Cette solution fournit des préparations qui sont d'abord extrêmement belles, mais qui sont bientôt ruinées par la formation de cristaux ou d'un précipité amorphe.

Comme je l'ai dit plus haut, cette solution me paraît être *de toute confiance pour la durée;* je n'ai pas eu une seule préparation détériorée.

Pour la faire, j'ajoute peu à peu des morceaux de colophane à de l'essence de térébenthine tenue dans une étuve, et je filtre deux fois, toujours à l'étuve. Il faut en tout une quinzaine de jours.

404. Térébenthine de Venise. — Vosseler (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 3, 1889, p. 292) préconise cette substance comme ayant des avantages considérables vis-à-vis du baume et du damar. On prend de la térébenthine de Venise commerciale, on la met dans un verre cylindrique haut avec un volume égal d'alcool à 96 p. 100 ; on laisse le tout en un lieu chaud pendant trois à quatre semaines, et l'on décante.

Vosseler dit qu'on peut monter dans ce médium sans passer par un agent éclaircissant. L'indice de réfraction est inférieur à celui du baume. Les teintures s'y conservent bien.

Ce médium est également recommandé par Suchannek (*ibid.*, VII, 4, 1891, p. 463). Cet auteur recommande de le préparer avec des parties égales de térébenthine de Venise et alcool absolu neutre (préparé en traitant l'alcool absolu du commerce par le sulfate de cuivre calciné et la chaux vive, n° 88). Le mélange doit être fréquemment agité, et être maintenu à l'étuve pendant un jour ou deux jusqu'à ce qu'il soit devenu limpide et d'une consistance suffisante.

405. Vernis copal. — J'ai vu de fort belles préparations montées dans ce milieu. Je l'ai essayé moi-même et n'ai pas réussi.

406. Styrax et liquidambar. — Voyez entre autres Van Heurck (*Bull. Soc. Belg. Mic.*, 1883, p. 134-136 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 741) ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, June 1884 ; F. Kitton (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1884, p. 318) ; A.-B. Aubert (*Amer. Mon. Mic. Journ.*, 1885, p. 86 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 744), et Fol, *Lehrbuch*, p. 141.

L'indice de réfraction de ces résines est extrêmement élevé (1,585, celui du baume de Canada étant de 1,540). Or, c'est précisément ce qui ne doit pas être pour les préparations histologiques. De plus, le styrax a une couleur brune très foncée. Il convient, semble-t-il, de laisser ces milieux aux diatomistes.

407. Huile de ricin. — Grenacher, qui l'a employée pour monter des coupes d'yeux de Céphalopodes, explique (*Abhandl. d. naturforsch. Gesellsch*,

Digitized by Google

Halle a. S., Bd XVI ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 244) que l'huile de ricin a un indice de réfraction de 1,49 (bien inférieur à celui du baume de Canada, 1,54). Elle rend donc les objets beaucoup moins transparents que le baume et doit donner une augmentation considérable de visibilité pour les éléments les plus réfringents des tissus. L'huile de ricin étant soluble dans l'alcool, on peut y porter directement les objets à la sortie de l'alcool absolu. Je l'ai essayée, et je n'ai pas eu de bons résultats.

408. Résine sandaraque (LAVDOWSKY, cité d'après *Ref. Handbook Med. Sc.*, *Supp.*, p. 438). — Résine Sandaraque, 30 gr. ; alcool absolu, 50 gr. On peut l'employer sans passer par une essence.

409. Vernis photographique, employé par WEIGERT pour monter de grandes coupes sans verre à couvrir, voyez *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 2, 1887, p. 209.

Digitized by Google

CHAPITRE XX

LUTS ET VERNIS

410. Choix d'un lut ou d'un vernis. — Les luts servent à maintenir solidement en place les cellules et les verres à couvrir, et à empêcher le contact entre le liquide d'inclusion et l'air ; on leur demande surtout une grande puissance d'adhésion au verre. Les vernis servent à fermer encore plus hermétiquement les bordures, et à protéger le lut lui-même contre l'influence désintégrante de l'air et contre les liquides employés avec les objectifs à immersion.

Avec CARPENTER nous ferons observer que les luts *ne doivent jamais contenir aucun mélange de particules solides ;* car les luts qui en contiennent peuvent avoir beaucoup d'adhésion au début, mais deviennent toujours poreux tôt ou tard, et laissent sortir le liquide d'inclusion et entrer l'air.

BEHRENS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, II, 1885, p. 54) a fait des expériences suivies sur la solidité des luts usuels, et il est arrivé à la conclusion que les luts qui montrent le plus de ténacité sont ceux qui sèchent le plus lentement ; les luts qui sèchent vite ont le défaut de devenir cassants. Il est donc bon d'éviter les luts et les vernis dont le menstrue est un corps très volatil, comme le chloroforme, l'éther, l'alcool ou la benzine. Nous devons dire cependant que nous pensons qu'on fera bien de ne pas prendre cette généralisation trop à la lettre ; car l'un des meilleurs luts qui nous soient connus est certainement le mastic de Bell, dont le menstrue paraît être, en partie du moins, l'éther.

Dans le tableau suivant nous donnons les résultats des expériences d'AUBERT (*Amer. Mon. Mic. Journ.*, 1885, p. 227 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 173) sur la puissance d'adhésion de divers mastics :

Mastic au caoutchouc, de Miller	1000
Mastic de Bell	735

Digitized by Google

Baume de Canada	664
Mastic de Lovett (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 786	626
Styrax d'Amérique	575
Mastic de King	532
« Gold size »	395
Glu marine (en solution)	304
« Zinc white cement »	241

Le « gold size » employé aurait donné des résultats plus satisfaisants s'il avait été convenablement durci.

A consulter aussi. — Aubert, *The Microscope*, XI, 1891, p. 150 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 692 ; Beck, *The Microscope*, XI, 1891, p. 338, 368, et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 293 ; et la dernière éd. des *Tabellen* de Behrens (Bruhn, Braunschweig, 1892).

411. Manière de luter les préparations faites dans les milieux liquides. — La manière la plus sûre de fermer une préparation montée, par exemple, dans la glycérine, est la suivante. Avec une paire d'emporte-pièce d'acier nous découpons des anneaux de papier d'environ un millimètre de largeur. On choisit un de ces anneaux, d'une dimension correspondant à celle du verre à couvrir employé ; il est bon que l'anneau ait un diamètre d'un millimètre de moins que celui du verre à couvrir. On pose l'anneau, humecté avec un peu du liquide d'inclusion, sur le porte-objet ; on remplit de liquide d'inclusion la cellule ainsi formée ; on y introduit l'objet ; on pose le verre à couvrir, qui doit dépasser d'un demi-millimètre l'anneau de papier ; on remplit de gelée à la glycérine la rigole circulaire formée par le débordement du verre à couvrir ; et aussitôt que la gelée s'est solidifiée on applique avec une tournette une bordure de lut ou de vernis.

Il va sans dire qu'on ne peut pas toujours employer des cellules de papier ; mais, suivant nous, il est essentiel d'employer toujours la bordure préliminaire de gelée à la glycérine.

412. Lut à la gélatine (Marsh, *Section Cutting*, p. 104). — On fait ramollir dans l'eau 15 grammes de gélatine, on fait fondre, on ajoute 3 gouttes de créosote, et l'on conserve dans un flacon bouché. Pour s'en servir, on la fait fondre.

Après avoir appliqué une bordure de cette gélatine, on peut, ou bien appliquer une bordure d'un autre lut ou vernis, ou bien procéder ainsi : on attend que la gélatine se soit solidifiée ; puis on la badigeonne avec une solution à 2 p. 100 de bichromate de potasse

Digitized by Google

dans l'eau. Cela doit se faire à la lumière du jour ; sous l'influence de la lumière, la gélatine passe à l'état insoluble. On finit la préparation avec une couche d'un lut ou d'un vernis quelconque. Nous recommandons toutefois le mastic de Bell.

413. Mastic de Bell (Bell's microscopical Cement). — Composition inconnue. Paraît être une solution de gomme-laque dans l'alcool et l'éther, avec peut-être un peu de baume de Canada. On se le procure chez J. Bell and C°, chemists, 338, Oxford street, London, et chez les opticiens,

Ce mastic a la consistance d'un vernis ; il coule librement du pinceau, et sèche vite. On peut l'allonger avec l'éther ou le chloroforme. Il n'est pas attaqué par l'essence de cèdre employée pour les objectifs à immersion homogène. C'est la préparation que nous employons le plus, soit comme lut, soit comme vernis. Après une expérience de plus de vingt ans, nous pouvons assurer que ce mastic est d'une très grande durée, et nous le recommandons particulièrement.

414. Bitume de Judée. — Se trouve dans le commerce. Cette substance est soluble dans l'essence de térébenthine, la benzine, le naphte et d'autres menstrues. Il faut éviter d'employer les espèces brutes et presque toujours inférieures que l'on trouve chez les droguistes ; le mieux est de ne se servir que des dissolutions toutes faites que l'on trouve chez les opticiens. D'après le *Micrographic Dictionary*, ces préparations consisteraient en du bitume de Judée dissous dans de l'huile de lin bouillante, ou dans l'essence de térébenthine. ou dans un mélange des deux. D'après Fol, la présence d'un peu d'huile de lin est en tout cas nécessaire pour assurer une ténacité permanente dans le vernis. Kitton (*Mon. Mic. Journ.*, 1874, p. 34) recommande le bitume dissous dans la benzine avec addition d'une faible proportion de gold-size.

Pourvu qu'il soit de bonne qualité, le bitume de Judée est certainement un excellent mastic.

415. Vernis noir Brunswick (« Brunswick Black »). — Se trouve chez les opticiens. Pour la manière de le préparer, voyez Beale (*How to work*, etc., p. 49).

Ce vernis est soluble dans l'essence de térébenthine. Il est agréable à manier et sèche bien. Il est particulièrement propre à faire des cellules avec la tournette.

416. Noir Brunswick et gold-size (Eulenstein, dans Beale,

Digitized by Google

loc. cit.). — Mélange à parties égales de noir Brunswick et de gold-size, avec une faible quantité de baume de Canada.

417. Gold-Size. — Se trouve dans le commerce et chez les opticiens. Nous recommandons de n'employer que le gold-size des opticiens ; et nous supprimons la formule pour la préparation, très compliquée, de ce mastic, étant convaincu que c'est là une préparation qu'il convient de laisser aux gens du métier. Soluble dans l'essence de térébenthine. Excellent pour faire des cellules à la tournette. Contrairement à l'avis de BEHRENS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 55), nous trouvons que le gold-size est un excellent lut, et très durable, *pourvu qu'il soit de première qualité.*

418. Glu marine (« **Marine glue** »). — Se trouve dans le commerce, et (en Angleterre du moins) chez les opticiens. D'après CARPENTER, la meilleure sorte est connue sous la marque GK4. On trouvera des formules pour la préparer, dans *Cooley's Cyclopædia.*

La glu marine s'emploie pour fabriquer les grandes cellules de verre ; elle est absolument indispensable pour cet objet, les autres ciments, du moins autant que nous les connaissons, ne possédant pas la ténacité nécessaire. Pour s'en servir, on en coupe de petits morceaux avec un scalpel et on les fait fondre sur place sur le porte-objet en chauffant celui-ci au moment d'appliquer la cellule. On enlève le surplus de mastic avec de la potasse caustique.

La glu marine est soluble dans l'éther, le naphte, la potasse caustique.

419. Mastic à la gutta-percha (HARTING). — Voyez BEALE, *loc. cit.*

420. Mastic au caoutchouc. — Voyez BEALE, *ibid.*

421.— Térébenthine de Venise (PARKER, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1882, p. 724 ; CSOKOR. *Arch. f. mik. Anat.*, 1882, p. 353). — On fait dissoudre de la térébenthine de Venise dans l'alcool en quantité suffisante pour faire une solution qui se laisse filtrer ; on filtre, et on évapore aux trois quarts sur un bain de sable. On doit obtenir une masse qui ne cède pas au doigt ; en en laissant tomber une goutte dans l'eau froide, elle doit se solidifier en une larme très dure, à fracture vitreuse.

Pour s'en servir, on emploie un fil de cuivre courbé à angle droit,

Digitized by Google

de manière à avoir un bras de la longueur du côté des verres à couvrir (qui doivent être carrés) qu'on emploie. On chauffe le fil de cuivre et on le plonge dans la masse de térébenthine ; on le retire, et on applique sur le bord du verre à couvrir la térébenthine fondue qu'il emporte. La térébenthine se durcit immédiatement, et la préparation est définitivement achevée aussitôt qu'on a ainsi luté les quatre côtés du verre à couvrir.

Ce mastic s'applique spécialement à la fermeture des préparations à la glycérine ; il est d'un emploi très commode et très sûr, et possède une grande ténacité.

On peut se servir de la térébenthine ordinaire du commerce ; et il n'est pas nécessaire de la dissoudre dans l'alcool,

422. Colophane et cire. (Krönig, *Arch. f. mik. Anat.*, 1886, p. 657 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 344). — Colophane, 7 à 9 parties ; cire fondue, 2 parties. On ajoute la colophane par petits morceaux à la cire, on filtre et laisse refroidir. Pour l'emploi, on fait fondre la masse en mettant le récipient qui la contient dans de l'eau chaude. Ce mastic résiste à l'action de l'eau, de la glycérine et de la potasse caustique.

423. Baume et paraffine (Apathy, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1889, p. 171). — Parties égales de baume du Canada et de paraffine dure (fondant à 60° C.). Chauffer ensemble jusqu'à ce que la masse prenne une teinte dorée et ne dégage plus de vapeurs de térébenthine. Au refroidissement la masse devient dure ; pour l'emploi on chauffe et on l'applique avec un agitateur de verre ou une spatule de laiton. Pour les préparations à la glycérine, il suffit d'une seule application. Ce mastic ne s'introduit jamais dans le liquide de la préparation et ne se fendille pas en séchant.

Voyez aussi la méthode (plus compliquée) de Julien, dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1893, p. 567.

424. Paraffine simple. — On fait des bordures *temporaires* ou préliminaires avec la paraffine en l'appliquant avec une aiguille courbée, comme nous venons de le dire pour la térébenthine, n° 421.

425. Baume de Canada. Damar. — On emploie quelquefois ces deux résines pour fermer les préparations dans les liquides. La meilleure manière de les employer est de faire une cellule avec le baume ou le damar, en se servant de la tournette, de déposer au milieu de cette cellule l'objet dans une goutte du liquide d'inclusion, et de poser le verre à couvrir qu'on fait

Digitized by Google

adhérer à la cellule par une légère pression. Après une expérience assez prolongée de cette méthode, nous devons dire que ni le baume ni le damar ne méritent confiance comme luts ; avec le temps ils finissent toujours par s'imbiber du liquide de la préparation, deviennent poreux et perdent leur ténacité.

426. Vernis à l'ambre. — D'après BEHRENS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 54), ce vernis constituerait un mastic d'une très grande durée, et serait peut-être supérieur à tous les autres sous ce rapport.

Behrens n'indique pas la composition de son vernis, qu'il s'était procuré chez E. PFANNENSCHMIDT, à Dantzig. Nous trouvons dans *Cooley's Cyclopædia* la formule suivante : On fait fondre 6 parties d'ambre, et on ajoute 8 parties d'huile de lin dégraissée chaude ; on fait bouillir jusqu'à ce que la masse devienne filante ; on laisse un peu refroidir et on ajoute 16 parties, ou une quantité suffisante d'essence de térébenthine. Ce vernis est très dur, et l'un des plus durables des vernis à l'huile.

427. Vernis à l'ambre et au copal (HEYDENREICH, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 338). — Heydenreich recommande comme étant d'une solidité à toute épreuve un mélange de vernis copal et vernis à l'ambre. Comme la préparation de ce mélange est extrêmement longue et compliquée, nous pensons que peu d'anatomistes voudront se donner la peine de l'entreprendre ; d'autant plus que l'on peut se procurer le mélange préparé d'après la formule de Heydenreich chez LUDWIG MARX, à Saint-Pétersbourg, Moskowskaja Sastawa, n° 110 ; ou à Vienne, Gaden, n° 79 ; ou à Mayence, Roemerthal, n° 1. On trouvera des instructions très détaillées pour le préparer soi-même, *loc. cit.*

428. Gomme-laque (BEALE, *loc. cit.*). — Solution épaisse de gomme-laque dans l'alcool. Nous croyons que cette solution ne mérite pas grande confiance comme lut. Le *Mic. Dict.* recommande d'ajouter XX gouttes d'huile de ricin par 30 cc. de la solution. Comme vernis, la gomme-laque sert à protéger les bordures contre l'essence de cèdre employée avec les objectifs à immersion homogène.

Pour une méthode un peu compliquée pour la préparation de gomme-laque chimiquement pure (ce qui offre de sérieux avantages), voyez WITT, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 1886, p. 199.

429. Cire à cacheter. — Solution très épaisse (ayant la consistance d'un mastic) de cire à cacheter dans l'alcool. Nous conseillons de ne pas l'employer comme lut, mais seulement comme vernis, et nous pensons que même pour cela elle n'est pas recommandable. Avec le temps elle devient cassante et s'écaille.

Digitized by Google

430. Baume de tolu (CARNOY, *Biologie cellulaire*, p. 129).

Baume de tolu.	2	parties.
Baume de Canada	1	—
Gomme-laque en sol. sat. dans le chloroforme.	2	—

On ajoute assez de chloroforme pour porter le mélange jusqu'à consistance sirupeuse. D'après Carnoy, ce mélange est le meilleur de tous les luts.

431. Mastic blanc de Ziegler. — Composition inconnue. Se trouve chez les fournisseurs de microscopie en Allemagne et en France. Ce mastic est très employé en Allemagne.

422. Mastic au blanc de zinc (STIEDA, *Arch. f. mik. Anat.*, 1866, p. 435). — On broie de l'oxyde de zinc avec de la térébenthine, et l'on ajoute, en remuant, pour 1 partie de l'oxyde, 8 parties d'une solution sirupeuse de résine damar dans l'essence de térébenthine. On obtient un mastic blanc qui ressemble à celui de Ziegler. Pour avoir un mastic rouge, on prend au lieu de zinc deux fois autant de cinabre. Ce mastic peut être allongé avec de l'essence de térébenthine, de l'éther ou du chloroforme. Nous devons ajouter que plusieurs auteurs se sont occupés récemment du « zinc white cement », et que tous sont d'accord pour trouver que ces compositions ne valent rien comme luts ; tout au plus peuvent-elles être utiles comme vernis.

433. Aspinall's Enamel. — C'est un vernis breveté, à demander chez les fournisseurs d'articles anglais. STANLEY KENT (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 821) le trouve très commode pour faire des cellules ou des bordures.

Digitized by Google

Digitized by Google

DEUXIÈME PARTIE

MÉTHODES SPÉCIALES ET EXEMPLES

Dans cette deuxième partie, nous donnons les détails de certaines méthodes spéciales que, dans l'intérêt de la clarté de l'exposition, nous n'avons pu admettre dans notre première partie. Nous y avons ajouté une série de paragraphes contenant un résumé des méthodes qui ont été employées par les anatomistes pour l'étude d'objets difficiles. Nous prions l'étudiant de bien vouloir considérer ces paragraphes à titre de renseignements historiques, et non à titre de modèles à copier. Comme renseignements historiques, ils doivent lui être utiles, en lui enseignant ce qui a été déjà fait dans telle ou telle direction ; cette connaissance est une condition essentielle de tout perfectionnement dans les méthodes. Vouloir s'en servir à titre de modèles à copier, et s'en tenir là, serait faire preuve d'un esprit conservateur antiscientifique, et aboutirait à fermer la porte à tout progrès. Ajoutons que, si dans les études faciles — dans cette anatomie microscopique qui est presque de l'anatomie macroscopique — on peut se servir de méthodes simples et peu variées, il en est tout autrement dans les recherches vraiment délicates. Là, il ne saurait être question de copier les méthodes imaginées par les autres ou par soi-même ; car — c'est une vérité incontestable — chaque objet demande un traitement différent. On n'est histologiste qu'autant qu'on a acquis le don de deviner la diversité du traitement approprié à chaque objet d'étude ; et l'on n'acquiert ce don que par l'étude patiente et minutieuse de la nature des objets auxquels on a affaire.

Digitized by Google

CHAPITRE XXI

INJECTIONS. MASSES A LA GÉLATINE

434. Introduction. — Les masses à injection sont composées d'une matière colorée dite *masse colorante*, et d'un corps incolore propre à donner la consistance voulue, qu'on appelle le *véhicule*.

Nous pensons que pour l'étude de l'angiologie des Vertébrés l'étudiant fera bien de suivre de près les instructions magistrales de Robin et de Ranvier. Pour les injections d'Invertébrés (et même pour les Vertébrés s'il s'agit de démontrer en même temps que la distribution des vaisseaux les fins détails de tissus environnants) les masses à la glycérine sont souvent à préférer, et nous recommandons particulièrement les formules de Beale au bleu de Prusse. L'emploi de masses à la glycérine a cependant un inconvénient lorsqu'il s'agit de l'injection de pièces tout à fait fraîches, nous voulons dire de celles dans lesquelles la rigidité cadavérique ne s'est pas encore établie; c'est que ces masses excitent la contraction des artères, ce qui fait naturellement obstacle à l'introduction de la masse. Cet inconvénient se laisse souvent écarter par l'emploi du nitrite d'amyle comme vaso-dilatateur (paragraphe suivant).

435. Nitrite d'amyle comme vaso-dilatateur. — D'après Oviatt et Sargent (*St Louis Med. Journ.*, 1886, p. 207 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 341), il suffit souvent d'anesthésier le sujet par un mélange d'éther et de nitrite, et de l'asphyxier ensuite avec du nitrite pur. Puis ils recommandent qu'après que la mort a été amenée par l'exhibition du nitrite, on fasse une injection préalable d'un peu de nitrite dans de la solution physiologique de sel avant de pousser la masse colorée. Et en tout cas il est bon d'ajouter un peu de nitrite à la masse d'injection au moment de s'en servir. L'effet dilatateur de ce réactif est très grand.

Digitized by Google

FORMULES DE ROBIN

436. Véhicule à la gélatine (Robin, *Traité du Mic. et des Injections*, p. 30). — On prend de la colle de Paris, on la laisse ramollir dans l'eau, et on la fait dissoudre au bain-marie dans 7, 8, 9 ou même 10 parties d'eau. Selon Robin, c'est une erreur commune d'employer des solutions trop concentrées de gélatine. Ce véhicule peut maintenant être combiné avec la masse colorante au carmin, n° 438, avec la masse de ferrocyanure de cuivre, n° 439, avec le bleu de Prusse, n° 440, avec le cadmium, n° 441, avec le vert de Scheele, n° 442, avec des couleurs à l'aniline insolubles dans l'eau, mais qui se laissent mêler au véhicule après avoir été dissoutes dans un peu d'alcool (dans ce dernier cas, il faut prendre la glycérine au lieu d'alcool pour la conservation des pièces injectées).

Si l'on désire conserver ce véhicule pendant quelque temps, il faut prendre des précautions pour prévenir le développement de moisissures. Ni le camphre ni l'acide phénique ne suffisent. On peut couvrir la gélatine d'une couche d'alcool; la gélatine devient opaque, mais retrouve sa transparence aussitôt que l'alcool a été chassé par la chaleur. Ou bien on peut suspendre au bouchon du flacon qui la contient une éponge imbibée d'alcool et de quelques gouttes d'essence de térébenthine, en veillant à ce que l'éponge ne touche pas la gélatine.

D'après Hoyer (*Biol. Centralbl.*, 1882, p. 20-21), l'hydrate de chloral sert à conserver toutes ces masses. Il faut en ajouter plusieurs centièmes, au moins 2 p. 100.

437. Véhicule à la gélatine glycérinée (Robin, *loc. cit.*, p. 32). — On fait dissoudre au bain-marie 50 grammes de colle de Paris dans 300 cc. d'eau contenant de l'acide arsénieux en dissolution, on ajoute 150 grammes de glycérine et quelques gouttes d'acide phénique. A combiner avec l'une des six masses colorantes des six formules qui vont suivre.

Ce véhicule se conserve indéfiniment.

438. Masse au carmin (Robin, *loc. cit.*, p. 33). — On broie dans un mortier 3 grammes de carmin avec un peu d'eau et assez d'ammoniaque pour dissoudre le carmin. On ajoute 50 grammes de glycérine, et l'on filtre.

On mêle ensemble 5 grammes d'acide acétique et 45 grammes de glycérine, et l'on ajoute le mélange peu à peu au carmin, jusqu'à ce

Digitized by Google

qu'on ait obtenu une réaction faiblement acide, ce dont on s'assure à l'aide d'un morceau de papier tournesol humecté et tenu au-dessus du mélange.

On combine 1 partie de cette masse colorante avec 3 ou 4 parties du véhicule numéro 436 ou du véhicule numéro 437, ou du véhicule à la glycérine et alcool, ci-après, numéro 473.

439. Masse au ferrocyanure de cuivre (Robin, *loc. cit.*, p. 34).

(1) —	Ferrocyanure de potassium (sol. concentrée)	20 cc.
	Glycérine	50 —
(2) —	Sulfate de cuivre (sol. concentrée)	35 cc.
	Glycérine	50 —

On mêle peu à peu, et en agitant, les solutions (1) et (2). Au moment de s'en servir on combine le mélange avec 3 volumes de l'un des véhicules, numéros 436, 437 ou 473.

440. Bleu de Prusse (Robin, *loc. cit.*, p. 35). — On prend :

(1 —	Sulfocyanure de potassium (sol. sat.)	90 cc.
	Glycérine	50 —
(2) —	Perchlorure de fer liquide, à 30°	3 gr.
	Glycérine	50 —

On mêle peu à peu les deux solutions, et l'on combine le mélange avec 3 volumes de l'un des véhicules, numéros 436, 437 ou 473.

441. Cadmium (Robin, *loc. cit.*, p. 36). — Prenez :

(1) —	Solution saturée de sulfate de cadmiun	40 cc.
	Glycérine	50 gr.
(2) —	Solution saturée de sulfure de sodium	30 cc.
	Glycérine	50 gr.

Mêlez, en agitant, (1) et (2), et combinez avec 3 volumes de l'un des véhicules, numéros 436, 437 ou 473.

442. Vert de Scheele (Robin, *loc. cit.*, p. 37). — Prenez :

(1) —	Arséniate de potasse (sol. sat.)	80 cc.
	Glycérine	50 gr.
(2) —	Sulfate de cuivre (sol. sat.)	40 cc.
	Glycérine	50 gr.

Mêlez les deux solutions (1) et (2), et combinez avec 3 volumes de l'un des véhicules, numéros 436, 437 ou 473.

Digitized by Google

443. Couleurs à l'aniline (Robin, *loc. cit.*, p. 37). — On peut employer des couleurs à l'aniline comme matière colorante, à condition de choisir des couleurs qui ne soient pas solubles à l'eau, et d'éviter l'emploi de l'alcool dans le traitement ultérieur des pièces injectées. Robin recommande de dissoudre dans un peu d'alcool le bleu d'aniline, le violet d'aniline ou le jaune d'aniline, et de les combiner avec l'un des véhicules que nous avons cités. Les pièces peuvent être conservées dans la glycérine. Nous croyons que l'on n'a pas jusqu'ici trouvé le moyen d'employer les couleurs d'aniline d'une manière satisfaisante pour les injections.

MASSES AU CARMIN

444. Masse au carmin et à la gélatine (Ranvier, *Traité technique*, p. 116). — On prend 5 grammes de gélatine de Paris qu'on laisse ramollir dans l'eau pendant une demi-heure à une heure ; on la lave à l'eau distillée, on la laisse égoutter et on fait fondre au bain-marie. On ajoute peu à peu, et en remuant constamment, une solution de carmin préparée en broyant 2gr,5 de carmin avec un peu d'eau distillée et assez d'ammoniaque pour donner une solution transparente.

On doit maintenant avoir environ 15 cc. de solution ammoniacale de carmin dans la gélatine. Il s'agit alors de rendre cette solution aussi complètement neutre que possible. C'est un point très important ; car, pour peu que la solution soit ammoniacale, elle diffuse dans les tissus ; et si au contraire il y a un excès d'acide, le carmin se précipite en granulations qui rendent l'injection opaque par places, et peuvent même boucher les petits vaisseaux. Voici comment on peut obtenir la neutralisation complète de la masse. On maintient la gélatine carminée dans le bain-marie, et l'on ajoute, goutte à goutte, en remuant avec une baguette de verre, un mélange de 1 partie d'acide acétique cristallisable avec 2 parties d'eau. C'est par l'odeur que l'on reconnaît le moment où il faut cesser d'ajouter de l'acide acétique. Le mélange carminé exhale d'abord une forte odeur d'ammoniaque ; à mesure que l'on ajoute de l'acide acétique, cette odeur diminue, et il arrive un moment où elle est transformée en une odeur aigre. C'est le moment où il faut s'arrêter. Pour y arriver plus facilement, il est bon d'étendre, vers la fin de l'opération, la solution d'acide acétique avec de l'eau. Si, en examinant la liqueur au microscope, on reconnaît la présence de granulations, il faut considérer la masse comme perdue.

Ranvier trouve qu'il n'y a pas d'autre moyen certain d'arriver à la neutralisation parfaite. Il ne faut pas avoir confiance dans certaines

Digitized by Google

formules d'injections dans lesquelles les auteurs ont indiqué des proportions d'ammoniaque et d'acide acétique qui doivent se neutraliser. Les solutions d'ammoniaque que l'on a dans les laboratoires présentent en effet des richesses très diverses. La méthode de titrage de l'acide acétique et de l'ammoniaque dont on se sert, proposée par Frey, est également illusoire, parce qu'il arrive très souvent que la gélatine du commerce est acide, ce qui peut conduire à dépasser le point de neutralisation.

La masse ayant été neutralisée, on la filtre sur de la flanelle neuve.

445. Masse au carmin et à la gélatine (VILLE, *Gaz. hebd. d. Sciences méd. de Montpellier*, fév. 1882 ; à part, Delahaye et Lecrosnier, Paris, 1882). — Ville trouve, comme Ranvier, que le procédé de titrage recommandé par Frey est défectueux, non pas tant à cause de l'acidité des gélatines du commerce que pour un autre motif. En effet, lorsqu'on traite le carmin par l'ammoniaque, une certaine partie de l'ammoniaque se fixe sur le carmin pour donner une combinaison transparente rouge pourpre; et il reste un excès d'ammoniaque ; c'est la neutralisation de cet excès qu'il faut atteindre. Or, d'après la méthode de Frey, il faudrait employer une quantité d'acide suffisante pour neutraliser toute la proportion d'ammoniaque qu'on a ajoutée au carmin. Il n'est donc pas étonnant qu'on dépasse le point de neutralisation et qu'on obtienne une masse granuleuse.

Quant à l'acidité de la gélatine du commerce, on peut d'une manière bien simple se mettre à l'abri de cette cause d'erreur. Voici comment on y arrive : — au lieu de plonger la gélatine dans un bain d'eau, on la place dans un entonnoir effilé assez grand, ou mieux, dans un entonnoir à robinet. On dispose le tout sous une fontaine et on règle le filet d'eau de manière que la gélatine soit bien immergée. On lui fait subir un lavage prolongé (une heure environ) qui lui enlève les traces d'acide mécaniquement retenu. Ville a constaté que des gélatines franchement acides perdent bien vite cette réaction quand on les soumet à ce traitement.

Quant à la neutralisation de la masse, Ville trouve que le critère de la neutralisation donné par Ranvier — l'odeur aigre qui succède à l'odeur ammoniacale — est peu sûr à réaliser dans la pratique. Car, après une série d'essais, le sens olfactif s'émousse, et cela juste au moment où il faudrait qu'il intervînt avec le plus de finesse en vue de la neutralisation partielle déjà accomplie, ce qui rend l'investigation très difficile.

Il est bien préférable, selon Ville, de se servir de papier de tournesol sensibilisé, ou dichroïque, qui, comme on le sait, peut être indistinctement appliqué à la recherche des acides ou des bases.

Pour préparer ce papier, on acidule légèrement, par un excès d'acide sulfurique, la teinture obtenue par décoction de pain de tournesol. On neutralise ainsi l'excès d'alcali ou de carbonate alcalin que renferme toujours cette décoction et qui diminue la sensibilité du réactif. On agite à chaud avec un excès de carbonate de baryte précipité, et on filtre.

Cette solution sensible de tournesol est exposée à l'air dans de larges vases, jusqu'à ce que sa couleur bleue intense ait fait place à une teinte

Digitized by Google

rougeâtre. On immerge dans cette solution des bandes de papier blanc non collé, que l'on fait sécher ensuite à l'ombre, sur des fils tendus, en ayant bien soin d'éviter la présence des vapeurs ammoniacales.

Si cette opération paraît trop longue, on peut se contenter d'ajouter à la teinture de tournesol des laboratoires de l'acide sulfurique très dilué, goutte à goutte jusqu'à la coloration rouge. Alors, par l'addition successive de traces d'alcali et d'acide sulfurique en solutions très étendues, on cherchera à obtenir la teinte rougeâtre ou dichroïque. La teinture de tournesol ainsi sensibilisée sert à préparer le papier, en opérant comme dans le premier cas.

Ce papier de tournesol sensibilisé permet de déceler des traces infinitésimales de vapeurs ammoniacales; Ville a constaté qu'il donne une réaction très nette et très rapide alors que le sens olfactif le mieux doué était depuis longtemps impuissant à percevoir la moindre odeur ammoniacale.

On emploie ce papier, comme le papier réactif ordinaire, en le mouillant d'eau distillée, et en l'approchant aussi près que possible de la masse à injection maintenue au bain-marie. Il bleuit d'abord très vite et très nettement; mais, à mesure qu'on ajoute de nouvelles quantités d'acide, cette réaction s'affaiblit, et bientôt le changement de couleur ne se fait que d'une façon très lente. C'est à ce moment qu'il faut cesser l'addition d'acide; l'opération est terminée.

On peut aussi préparer du papier sensibilisé d'une grande délicatesse avec d'autres réactifs, le *réactif de Nessler*, l'hématoxyline en solution alcoolique, et, surtout, une solution faite ainsi qu'il suit : — on prend de la liqueur orange numéro 3 (liqueur qui se trouve dans le commerce, et qui est employée pour la reconnaissance des acides); on y ajoute une trace d'acide sulfurique dilué; la liqueur change d'aspect et prend une coloration groseille.

On peut faciliter la préparation de la masse à injection en tenant une provision d'acide acétique et d'ammoniaque de concentration connue. Avec l'acide acétique on n'aura pas de difficulté; il suffit de conserver de l'acide cristallisable dans un flacon bien bouché. Mais il n'en est pas de même pour la solution ammoniacale. Il ne suffit pas de la maintenir dans un vase hermétiquement fermé, car les transvasements à l'air libre, surtout s'ils étaient répétés, feraient varier d'une manière notable la richesse de la solution. Ville a imaginé un appareil qui permet de conserver la solution d'ammoniaque dans un vase hermétiquement clos, et d'en soutirer à volonté une quantité connue sans que l'air ait accès sur le reste de la solution. Nous ne pouvons donner ici la description de cet appareil, qui serait longue et ne serait pas compréhensible sans les figures destinées à l'expliquer; on trouvera la description et la planche des figures dans le mémoire original de Ville.

Sauf les différences que nous avons mentionnées, Ville prépare la masse à injection selon les prescriptions de Ranvier.

446. Masse au carmin et à la gélatine (Hoyer, *Biol. Centralb.*, 1882, p. 21). — A une solution concentrée de gélatine on ajoute une quantité correspondante de solution ammoniacale de carmin neutralisée; on fait digérer le mélange au bain-marie jusqu'à ce

Digitized by Google

que sa couleur rouge violet commence à passer à une nuance rouge clair; on ajoute 5 à 10 p. 100 de glycérine; et au moins 2 p. 100 d'hydrate de chloral (en solution forte), on filtre à travers de la flanelle, et l'on conserve la masse dans une capsule couverte par un globe de verre. Elle se maintient sans altération pendant des mois.

447. Masse au carmin et à la gélatine (Fol, *Zeit. wiss. Zool.* 1883, p. 492, et *Lehrb.*, p. 13). — On prend 1 kilogramme de gélatine fine [1] qu'on laisse ramollir pendant deux ou trois heures dans une faible quantité d'eau. On la fait fondre, et on ajoute 1 litre de solution ammoniacale concentrée de carmin (solution forte d'ammoniaque, 1 partie; eau, 3 ou 4 parties; carmin, à saturation; filtrer, pour enlever l'excès de carmin qui doit se trouver dans la solution). On agite continuellement pendant que l'on verse le carmin. On neutralise à peu près (il n'est pas nécessaire que la neutralisation soit complète, pourvu qu'on ne la dépasse pas, ce qui précipiterait le carmin) avec de l'acide acétique. On laisse la masse se solidifier, et on la découpe en morceaux qu'on enveloppe dans du tulle ou dans un filet fin. On pétrit la masse ainsi enveloppée avec la main dans de l'eau contenant 0,1 p. 100 d'acide acétique; par la pression la masse est exprimée à travers les mailles du filet sous forme de vermicelles. On lave ces vermicelles pendant plusieurs heures sur un tamis à travers lequel on fait passer un courant d'eau. On les fait fondre et on verse la masse fondue en une couche mince sur du papier parchemin imbibé de paraffine. On met les feuilles de papier sécher dans un endroit sec. Lorsque la masse est sèche, elle se laisse séparer du papier sous forme de feuilles qu'on découpe en bandes avec des ciseaux, et qu'on met dans un flacon pour les conserver. Pour s'en servir, il n'y a qu'à ramollir dans l'eau pendant quelques minutes la quantité voulue, et la faire fondre au bain-marie dans 10 à 20 parties d'eau.

Les avantages de cette méthode de préparation sont : que la masse se conserve indéfiniment, ce qui, selon Fol, ne serait pas le cas avec la masse au chloral de Hoyer; et que sa préparation est facile, vu qu'elle exige moins que les autres masses la neutralisation exacte de la solution de carmin.

On peut simplifier ce procédé de la manière suivante, sans que les résultats en soient de beaucoup inférieurs. On prend de la gélatine en

Fol recommande la gélatine photographique qu'on se procure à la Simeon's *Gelatine-fabrik*, Winterthur (Suisse); il est probable que la gélatine protographique de Coignet, à Paris, donnerait le même résultat.

Digitized by Google

lames (ou mieux de la gélatine photographique molle). On laisse macérer ces feuilles pendant deux jours dans une quantité suffisante de la solution de carmin que nous avons décrite. On les rince et on les met pendant quelques heures dans de l'eau acidulée par l'acide acétique. Puis on les lave pendant plusieurs heures sur un tamis avec de l'eau courante; on les sèche sur du papier parchemin, et on conserve comme nous l'avons dit.

448. Autres masses au carmin et à la gélatine. — GERLACH (*Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 148, et le *Traité* de RANVIER, p. 118). — THIERSCH (*Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 148). — CARTER (BEALE, *How to work.*, etc., p. 113). — DAVIES (*Prep. and Mounting of Mic. Objects*, p. 138).

MASSES BLEUES

449. Bleu de Prusse de Robin. — Voyez numéro 440.

450. Bleu de Prusse de Ranvier (*Traité*, p. 119). — On prend 1 partie de gélatine solide et 25 parties de solution saturée de bleu de Prusse (préparée comme nous le dirons tout à l'heure). Laisser ramollir la gélatine une demi-heure à une heure dans l'eau; la laver à l'eau distillée et la faire fondre dans une éprouvette au bain-marie. Mettre la solution de bleu de Prusse dans une autre éprouvette plongée dans le même bain-marie, pour la maintenir à la même température que la gélatine. Verser la gélatine peu à peu dans le bleu de Prusse; maintenir le mélange dans le bain-marie et remuer continuellement avec un agitateur de verre jusqu'à ce que le précipité grumeleux qui s'est formé au premier moment ait disparu. On constate que le bleu est parfaitement dissous lorsque la baguette de verre retirée du liquide ne présente pas de granulations bleues à sa surface. Filtrer sur de la flanelle neuve, et maintenir l'injection au bain-marie à la température de 40°, jusqu'à ce qu'on en remplisse la seringue.

Il y a des gélatines avec lesquelles il se produit un précipité persistant; il faut les rejeter absolument; mais il faut savoir que le précipité qui se forme toujours, même avec la meilleure gélatine, disparaît quand on continue de chauffer.

La solution de bleu de Prusse se prépare ainsi :

On prend une solution concentrée de sulfate de protoxyde de fer dans l'eau distillée, et on la verse lentement dans une solution concentrée de prussiate jaune de potasse : il se précipite du bleu de

Digitized by Google

Prusse insoluble. A la fin de l'opération il doit rester un excès de prussiate de potasse dans la liqueur, ce dont on s'assure en en prenant une petite portion et en constatant qu'une nouvelle goutte de sulfate de fer y donne encore un précipité. On filtre sur une chausse de feutre. Au-dessous de celle-ci est disposé un entonnoir de verre avec un filtre en papier. Le liquide coule d'abord clair et jaunâtre dans l'entonnoir inférieur. On ajoute par petites quantités de l'eau distillée dans la chausse, et l'on continue à laisser filtrer; peu à peu le liquide sort de la chausse légèrement teinté en bleu, mais au-dessous du second filtre il ne présente pas cette coloration. On continue ainsi pendant plusieurs jours à ajouter de l'eau distillée dans la chausse, jusqu'à ce que le liquide bleuisse au-dessous du second entonnoir, dans le flacon disposé pour cela. A ce moment, le bleu de Prusse est devenu soluble. Pour le recueillir, il faut retourner la chausse et l'agiter dans l'eau distillée. Le bleu s'y dissout, si la quantité d'eau est suffisante.

La solution ainsi obtenue peut être conservée telle quelle pour les injections, mais, comme il est plus commode d'avoir une provision de bleu de Prusse soluble à l'état solide, il est utile de l'évaporer à l'étuve et de conserver le résidu solide dans des flacons. Pour s'en servir on le fait dissoudre à saturation dans l'eau distillée; pour les injections il est toujours nécessaire que la solution soit saturée.

On peut injecter cette solution telle quelle; jamais elle ne transsude à travers les parois des vaisseaux. On peut aussi mélanger ce bleu de Prusse avec la glycérine au quart.

Ranvier a trouvé que les injections au bleu de Prusse soluble sont les seules qui lui aient donné de très bons résultats.

451. Bleu de Berlin soluble (Brücke, *Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 87). — On verse dans une solution concentrée (10 p. 100 ou plus) de ferrocyanure de potassium une quantité de solution diluée de perchlorure de fer telle que le poids du perchlorure qu'elle contient soit le 1/8 ou le 1/10 de celui du ferrocyanure. On met le précipité sur une chausse, et on le lave avec l'eau mère jusqu'à ce qu'il ne s'écoule plus qu'un liquide jaune; puis on le lave, toujours sur la chausse, avec de l'eau distillée jusqu'à ce que le liquide filtré passe bleu; alors on sèche le précipité, on le comprime dans une presse entre des feuilles de papier buvard, on brise en morceaux la masse comprimée, et on sèche les morceaux à l'air.

Ou bien en emploie le procédé suivant, qui a l'avantage d'être moins coûteux :

On fait une solution de ferrocyanure de potassium contenant 217 grammes de sel par litre d'eau, et l'on ajoute 2 volumes de solution saturée de sulfate de soude. On fait aussi une solution de 1 partie de chlorure de fer sec du commerce dans 10 parties d'eau, et on ajoute également 2 volumes de solu-

Digitized by Google

tion saturée de sulfate de soude. On ajoute, en remuant, 1 volume de la solution de chlorure à 1 volume de la solution de ferrocyanure. On met sur une chausse le précipité qui se forme, on le lave et on traite pour le reste comme ci-dessus.

Pour se servir de ce bleu soluble, on en combine la solution saturée avec assez de gélatine pour former une gelée après refroidissement. Chauffer à 60° environ, et injecter avec une seringue chauffée; il n'est pas nécessaire de chauffer le sujet. Il vaut mieux, selon Brücke, éviter la glycérine pour monter les pièces, la glycérine ayant pour effet de faire pâlir la couleur (nous pensons cependant que la glycérine doit suffire à conserver la couleur, si elle est acidulée par l'acide acétique (1 p. 100 environ).

452. Bleu de Prusse (Thiersch, *Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 148). — On prend :

1° Une solution saturée de sulfate de fer;

2° Une solution saturée de prussiate rouge (ferricyanure) de potassium;

3° Une solution saturée d'acide oxalique;

4° Une solution de 1 partie de gélatine dans 2 parties d'eau.

On mêle 12 cc. de la solution de sulfate de fer avec 30 grammes de la solution de gélatine, à une température de 25° R.

Puis on mêle, à la même température, 24 cc. de la solution de ferricyanure avec 60 grammes de la solution de gélatine, et l'on ajoute 24 cc. de la solution d'acide oxalique. On agite bien, puis on ajoute le mélange de gélatine et de sulfate de fer. On maintient le tout à la température de 20° à 25° R., en remuant toujours, jusqu'à ce que tout le bleu de Prusse soit précipité. On chauffe alors à 70° R., et l'on filtre sur de la flanelle.

453. Masse au bleu de Berlin soluble (Hoyer, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 649). — Hoyer recommande de précipiter du bleu de Berlin, et de le mettre avec un peu d'eau dans un dialyseur. On change l'eau extérieure jusqu'à ce que le bleu de Prusse commence à dialyser à travers le parchemin. On peut alors, après avoir allongé le bleu de Prusse avec de l'eau, le filtrer sur du papier, opération qui devient facile après la dialyse.

On peut injecter la solution telle quelle, ou la combiner à la gélatine.

A cet effet, il convient de mêler d'abord une petite quantité d'une solution très diluée et chauffée de bleu de Berlin avec une petite quantité d'une solution modérément diluée de gélatine; on obtient ainsi une solution parfaitement claire et homogène qu'on peut alors additionner de solution de gélatine plus concentrée et de solution de bleu de Berlin plus concentrée.

Digitized by Google

On procède ainsi jusqu'à ce qu'on ait obtenu une masse saturée de bleu de Berlin, mais parfaitement homogène et transparente. Hoyer a toujours trouvé qu'en mêlant la gélatine et le bleu de Berlin sans cette précaution on obtient une masse granuleuse ou grumeleuse. Par l'addition d'hydrate de chloral (n° 415), cette masse peut être conservée sans altération pendant longtemps.

454. Masse au bleu de Berlin (Fol, *Zeit. f. wiss. Zool.*, 1883, p. 494; *Lehrb.*, p. 14). — Fol recommande de faire une masse en gélatinisant le bleu de Berlin soluble du commerce, ou bien celui de Brücke. Ce bleu ne se conservant pas très bien, le bleu de Prusse de Thiersch (n° 452) lui est préférable sous ce rapport. On peut injecter la masse telle quelle, ou bien on peut la laisser solidifier et l'envelopper dans du tulle ou un filet fin et la comprimer en vermicelles sous l'eau, comme nous l'avons dit ci-dessus (n° 447), laver ces vermicelles, les mettre sécher sur du papier parchemin, et les conserver dans des flacons. Pour s'en servir, on les laisse ramollir dans l'eau et on les fait fondre avec une addition d'acide oxalique suffisante pour permettre d'obtenir la solution complète. (On ne peut pas faire fondre les vermicelles avant de les sécher, parce qu'ils ne fondent pas assez bien sans l'addition d'acide oxalique.)

455. Bleu de Prusse soluble de Guignet. — Voyez *Journ. de microgr.*, 1889, p. 94.

AUTRES COULEURS

456. Masse jaune au cadmium (Robin). — Voyez numéro 441.

457. Masse jaune au chromate de plomb (Thiersch, *Arch. f. Mik. Anat.*, 1865, p. 149). — On prend :

1° Une solution de 1 partie de gélatine dans 2 parties d'eau ;

2° Une solution de 1 partie de chromate neutre de potasse dans 11 parties d'eau ;

3° Une solution de 1 partie d'azotate de plomb dans 11 parties d'eau.

On mêle 4 parties de la solution de gélatine avec 2 parties de la solution de plomb. Dans un autre récipient on mêle 4 parties de la solution de gélatine avec 1 partie de la solution de chromate de potasse. On chauffe à 25° R. et l'on mélange les deux solutions ainsi obtenues, en remuant constamment, jusqu'à ce que tout le chromate de plomb se soit précipité ; puis on chauffe à 70° R. et on filtre à travers de la flanelle.

Digitized by Google

Cette masse est très belle. Fol fait observer qu'il faut toujours la préparer au moment de s'en servir, car le chromate de potasse employé fait bientôt passer la gélatine à l'état insoluble.

458. Masse jaune au chromate de plomb (Hoyer, *Arch. f. mik. Anat.*, 1867, p. 136). — On prend :

1 volume d'une solution de 1 partie de gélatine dans 4 parties d'eau;
1 volume de solution saturée de bichromate de potasse ;
1 volume de solution saturée d'acétate neutre de plomb.

On ajoute la solution de bichromate à la solution de gélatine. On chauffe presque à ébullition, et l'on ajoute la solution d'acétate de plomb, préalablement chauffée. On laisse refroidir à la température du sang et l'on injecte de suite.

On peut varier la préparation de la manière suivante : on mêle la solution de plomb à une partie de la solution de gélatine, et la solution de bichromate à une autre partie; on chauffe ce dernier mélange, et l'on y ajoute graduellement le premier en remuant constamment.

Il ne faut jamais mêler les solutions à une température basse, parce qu'il se forme alors un précipité à granulations grumeleuses. De plus, en ce cas, on obtient un précipité jaune vif; tandis qu'en mêlant l'acétate à une solution chaude de bichromate on obtient un précipité d'une belle couleur rouge orange.

On peut garder en provision les solutions d'acétate et de bichromate, ce qui permet de préparer très rapidement la masse au moment de s'en servir.

Cette masse est presque transparente, pénètre bien, même dans les lymphatiques les plus fins, et, ayant une couleur beaucoup plus intense que la masse de Thiersch, rend les vaisseaux beaucoup plus distincts. Elle est aussi plus facile à manier que la masse de Thiersch, parce qu'elle se solidifie moins rapidement. Elle donne de bonnes images soit à la lumière transmise, soit à l'éclairage direct.

459. Masse jaune au chromate de plomb (Fol, *Lehrb.*, p. 15). — On fait une solution de 60 parties d'acétate de plomb dans 100 cc. d'eau, et une solution de 25 parties de bichromate de potasse dans la même quantité d'eau. On mêle les deux solutions avec précaution dans un verre cylindrique ; il se précipite du chromate de plomb. On laisse ce précipité déposer, on décante, on lave le précipité à l'eau distillée, et on l'ajoute sans tarder à une solution de gélatine. Il ne faut pas laisser le précipité demeurer longtemps dans l'eau, car il s'y produirait alors des granulations grossières.

Cette masse est moins belle que celle de Thiersch, mais se conserve mieux.

460. Masse jaune au nitrate d'argent (Hoyer, *Biol. Centralb.* 1882, p. 21). — On mêle à chaud un volume de solution concentrée de gélatine et 1 volume d'une solution de nitrate d'argent à 4 p. 100 ; on chauffe et on ajoute une faible quantité d'une solution aqueuse

Digitized by Google

d'acide pyrogallique. L'argent se réduit en peu de secondes, et la masse prend une coloration brune ; elle paraît aussi brune dans les grands vaisseaux, mais jaune dans les capillaires. En ajoutant de la glycérine et de l'hydrate de chloral (n° 446), on peut la conserver pendant longtemps. Les pièces injectées peuvent être traitées par l'alcool, l'acide acétique, l'acide chromique, ou les bichromates, sans que l'injection en soit affectée.

461. Masses vertes (Hoyer, *loc. cit.*, p. 22). — On obtient de bonnes masses vertes en combinant une masse bleue et une masse jaune.

462. Masse au vert de Scheele (Robin). — Voyez numéro 442.

463. Masse verte (Thiersch, *Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 149). — Combiner en diverses proportions la masse bleue numéro 452 et la masse jaune numéro 457.

464. Masse blanche au carbonate de plomb (Hartig, Frey, *Le Microscope*, p. 190). — On fait dissoudre 125 grammes d'acétate de plomb dans une quantité d'eau, telle que le tout pèse 500 grammes.

Et on fait dissoudre 95 grammes de carbonate de soude dans une quantité d'eau telle que le tout pèse 500 grammes.

On mêle ces deux solutions à volumes égaux, et l'on ajoute deux volumes de solution de gélatine.

465. Masse blanche au sulfate de baryte (Frey, *ibid.*). — On met dans un verre cylindrique 125 à 185 grammes de solution saturée de chlorate de baryte. On ajoute lentement, goutte à goutte, de l'acide sulfurique. On laisse déposer pendant douze heures le précipité qui se forme, et l'on décante. On prend le résidu mucilagineux formé par le précipité et on le combine à parties égales avec une solution concentrée de gélatine.

Cette masse est très fine. Les pièces injectées peuvent être conservées dans l'acide chromique.

466. Masse blanche au chlorure d'argent (Teichmann ; Frey, *loc. cit.*, p. 191). — On fait dissoudre 3 parties de nitrate d'argent dans une solution de gélatine, et l'on ajoute 1 partie de chlorure de sodium.

Cette masse est très fine, et n'est pas décomposée par l'acide chromique. Malheureusement elle noircit facilement.

Digitized by Google

467. Masse brune (Fol, *Zeit. f. wiss. Zool.*, 1883, p. 494, et *Lehrb.*, p. 16). — On fait fondre 14 grammes de sel de cuisine dans 200 cc. d'eau ; on ajoute 50 grammes de gélatine, on la laisse ramollir et on la fait fondre. A la masse fondue on ajoute graduellement, en remuant constamment, une solution de 30 grammes de nitrate d'argent dans 100 cc. d'eau. (Si l'on désire avoir une masse extrêmement fine, il faut allonger les deux solutions de deux ou trois volumes d'eau.) On laisse la masse se prendre, on l'enveloppe de tulle et on la traite comme nous l'avons dit pour la masse au carmin, numéro 447. On traite les vermicelles, à la lumière du jour, avec un mélange de solution saturée d'oxalate de potasse, 300 cc., et de solution de sulfate de fer, 100 cc., jusqu'à ce qu'ils paraissent entièrement noircis. On les lave, on les sèche, et, si on le désire, on les refond et on les conserve comme nous l'avons dit au numéro 447.

Cette masse est d'un brun sèpia à la lumière transmise. Si l'on préfère un ton noir gris, on n'a qu'à employer dans la première solution 25 grammes de bromure de potassium, au lieu du sel de cuisine.

468. Masse acajou (Robin). — Voyez numéro 439.

469. Masse à la gélatine pour imprégnations (Ranvier, *Traité*, p. 123).

Solution concentrée de gélatine . . .	2, 3 ou 4 parties.
Solution de nitrate d'argent à 1 p. 100	1 —

470. Métagélatine (Fol, *Lehrb.*, p. 17). — La nécessité de faire à chaud les injections ordinaires à la gélatine complique beaucoup les manipulations et peut souvent compromettre la réussite de l'opération. Dans le but d'éviter cette complication, on a proposé des masses mucilagineuses qui se laissent injecter à froid et coaguler ensuite dans les vaisseaux. Telles sont les masses au blanc d'œuf et à la gomme arabique. Ces masses ont l'inconvénient que le véhicule ne se prête pas bien à la préparation de la masse colorante; pour cette raison Fol propose de leur substituer la métagélatine.

Si on laisse cuire une solution de gélatine additionnée d'une faible quantité d'ammoniaque pendant plusieurs heures, elle passe à la fin à un état où elle n'est plus susceptible de se coaguler par le simple refroidissement : c'est la métagélatine. A cette solution, liquide à froid, de métagélatine, on peut ajouter des masses colorantes au bleu de Berlin, au jaune de chrome, ou autres. Ou bien, on peut cuire la

Digitized by Google

masse brune numéro 467 jusqu'à ce que la gélatine ait passé à l'état de métagélatine. On peut ajouter à la masse de l'alcool dilué ce qui lui donne une consistance plus liquide, et permet d'injecter les capillaires les plus fins. Après injection, on met les pièces dans l'alcool fort ou dans l'acide chromique; dans ces liquides la masse ne tarde pas à se coaguler.

D'après Fol, ces masses laissent peu à désirer sous le rapport de la commodité des manipulations.

Digitized by Google

CHAPITRE XXII

INJECTIONS. AUTRES MASSES

471. Masse au blanc d'œuf (Josepii, *Ber. naturw. Sect. Schles. Ges.*, 1879, p. 36-40 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1882, p. 274). — A du blanc d'œuf filtré on ajoute 1 à 5 p. 100 de solution de carmin. Cette masse reste liquide à froid ; elle se coagule par l'acide nitrique dilué, l'acide chromique ou l'acide osmique, tout en restant transparente ; les réactifs l'altèrent peu. Utile pour Invertébrés.

472. Masse à la gomme arabique (Bjeloussow, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1885, p. 379). — On fait une solution sirupeuse de gomme arabique, et une solution saturée de borax dans l'eau. On mêle ces solutions en des proportions telles qu'il se trouve dans le mélange une partie de borax pour deux de gomme arabique. On obtient une masse gélatineuse, presque transparente, et presque insoluble dans l'eau. On la broie avec de l'eau distillée, qu'on ajoute peu à peu ; puis on la force à passer à travers un linge fin. On répète ces opérations jusqu'à ce qu'on obtienne une masse liquide ne contenant plus de grumeaux gélatineux en suspension. (Si l'opération a réussi, la masse doit se coaguler en présence de l'alcool, en se dilatant au double de son volume.) On combine la masse avec la matière colorante que l'on veut, à l'exception toutefois du cadmium et du cobalt ; le carmin est peut-être le plus à recommander pour les injections fines. Après injection, on met les pièces dans l'alcool ; la masse s'y prend immédiatement, en augmentant de volume comme nous l'avons dit, ce qui fait que les vaisseaux se montrent toujours largement distendus.

Chez les animaux à sang froid, on peut pratiquer l'injection sur le vivant. Les pièces se conservent bien dans l'alcool. La glycérine les

Digitized by Google

rend très transparentes. La masse ne s'écoule pas des vaisseaux coupés. Désire-t-on éloigner la masse d'une partie de la préparation, on le fait facilement à l'aide d'acide acétique dilué, qui la dissout. Cette masse est très facile à préparer et commode à manier.

MASSES GLYCÉRIQUES A INJECTER A FROID[1]

473. Masse de carmin à la glycérine (Robin, *Traité du Mic.*, p. 33). — On fait le mélange suivant pour servir de véhicule :

Glycérine	2	parties.
Alcool	1	—
Eau	1	—

On combine 2 ou 3 volumes de ce véhicule avec 1 volume de la masse colorante au carmin numéro 438.

474. Masse de carmin à la glycérine (Beale; Ranvier, *Traité*, p. 119). — On fait dissoudre 25 centigrammes de carmin dans V ou VI gouttes d'ammoniaque et l'on ajoute 15 grammes de glycérine. Puis on ajoute encore graduellement 15 grammes de glycérine acidulée avec VIII à X gouttes d'acide acétique. On ajoute enfin un mélange de 15 grammes de glycérine, 3gr,5 d'alcool et 10gr,5 d'eau.

Ranvier dit avoir essayé ce liquide et avoir eu de mauvais résultats. Nous devons dire que nous l'avons essayé, et que nous avons eu des résultats assez satisfaisants pour que nous puissions le recommander comme étant très commode, quoiqu'il ne donne sans doute pas des résultats qui puissent prétendre à la beauté esthétique. Il faut avoir soin de ne pas trop neutraliser avec l'acide acétique.

475. Bleu de Prusse à la glycérine (Robin, *Traité*, p. 35). — A 2 volumes du véhicule glycérique numéro 473, on ajoute 1 volume de la masse colorante au bleu de Prusse, numéro 440.

[1] Les masses à la glycérine sont importantes parce que, s'injectant à froid, elles sont très commodes à employer. Et il nous semble qu'on ne peut pas nier qu'elles donnent de bons résultats. Nous avertissons qu'elles ont toutes un défaut lorsqu'il s'agit de l'injection des pièces fraîches, c'est-à-dire dans lesquelles la rigidité cadavérique ne s'est pas encore établie. C'est que la glycérine provoque la contraction des artérioles. Ces contractions sont souvent si violentes qu'il ne faut rien de moins qu'une masse très expérimentée pour vaincre la résistance qu'elles opposent au passage de la masse. Nous avons indiqué au numéro 435 une manière de remédier à cet inconvénient.

Digitized by Google

476. Bleu de Prusse à la glycérine (RANVIER, *Traité*, p. 120). — Trois volumes de solution saturée de bleu de Prusse dans l'eau (n° 450) et un volume de glycérine.

477. Bleu de Prusse à la glycérine (BEALE, *How to work*, etc., 4e éd., p. 93). — On fait dissoudre 75 centigrammes de ferrocyanure de potassium dans un mélange de 5gr,5 de glycérine avec 22gr,5 d'eau. On fait aussi un mélange de 1gr,75 de teinture de perchlorure de fer avec 5gr,5 de glycérine et 22gr,5 d'eau. On ajoute *très graduellement* ce dernier mélange à la solution de ferrocyanure, en agitant constamment et vigoureusement dans un flacon. On ajoute enfin, graduellement, en agitant toujours, un mélange de 28 grammes d'alcool avec 66 grammes d'eau.

Les pièces injectées doivent être conservées dans la glycérine acidulée avec environ 1 p. 100 d'acide acétique ; ou bien dans le baume de Canada.

Cette masse n'est pas très belle dans les capillaires, mais elle pénètre bien, elle est facile à préparer, et, d'après notre expérience, nous pouvons la recommander comme étant très commode et très utile. Nous lui préférons toutefois la suivante.

478. Bleu de Prusse à la glycérine pour injections très fines (BEALE, *l. c.*, p. 296). — On fait dissoudre 18 centigrammes de ferrocyanure de potassium dans 28 grammes de glycérine de Price. On fait aussi un mélange de 28 grammes de glycérine de Price, et de X gouttes de teinture de perchlorure de fer. On ajoute ce mélange, goutte à goutte, lentement, en agitant constamment et vigoureusement, dans un flacon à la solution de ferrocyanure de potassium. On ajoute 28 cc. d'eau avec III gouttes d'acide chlorhydrique concentré ; on peut ajouter aussi, si on le désire, 7 grammes d'alcool.

Nous trouvons cette formule vraiment excellente. Nous possédons un peu de ce liquide préparé il y a plus de cinq ans, qui a encore l'apparence d'une solution parfaite. Cette formule nous paraît préférable à la précédente sous tous les rapports, si ce n'est que la préparation en est plus coûteuse.

479. Bleu de Turnbull (Formule de BEALE, modifiée d'après celle de RICHARDSON ; BEALE, *loc. cit.*, p. 94). — On fait une solution de 30 centigrammes de sulfate de fer dans 28 grammes de glycérine. On fait aussi une solution de 60 centigrammes de ferricyanure (prussiate rouge) de potassium dans un peu d'eau, et on la mêle à

Digitized by Google

28 grammes de glycérine. On ajoute graduellement la solution de fer à la solution de ferricyanure, en agitant. Puis on ajoute, graduellement, en agitant, un mélange de 4 grammes d'alcool et 28 cc. d'eau.

Ce liquide a une couleur plus vive que le liquide au bleu de Prusse, et sa couleur passe pour être plus permanente.

480. Liquide acajou à la glycérine (Robin, *Traité*, p. 34). — Un volume de la masse colorante numéro 439 avec deux volumes du véhicule numéro 473.

481. Liquide au cadmium et à la glycérine (Robin, *loc. cit.*, p. 36). — Un volume de la masse colorante numéro 441 et deux volumes du véhicule numéro 473.

482. Liquide au vert de Scheele et à la glycérine (Robin, *loc. cit.*, p. 37). — Un volume de la masse colorante numéro 442 et deux volumes du véhicule numéro 473.

MASSES AQUEUSES

483. Bleu de Berlin (Müller, *Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 150). — On précipite une solution concentrée de bleu de Berlin soluble (voy. numéros 450, 451), en ajoutant de l'alcool à 90°. On obtient un précipité extrêmement fin, et l'on a un liquide *parfaitement neutre*. La préparation est on ne peut plus simple.

484. Bleu de Prusse (Ranvier, *Traité*, p. 120). — La solution saturée dans l'eau du bleu de Prusse soluble, numéro 450, peut être injectée telle quelle ; jamais elle ne transsude à travers les parois des vaisseaux.

485. Bleu de Berlin (Mayer, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 1888, p. 307). — On additionne un demi-litre d'eau de 10 cc. de teinture de perchlorure de fer, et on l'ajoute à une solution de 20 grammes de prussiate jaune de potasse dans un demi-litre d'eau. On laisse déposer pendant 12 heures, on décante, on prend le dépôt et le lave sur un filtre avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage devienne d'un bleu foncé, puis on fait dissoudre dans environ un litre d'eau.

486. Vanadate d'ammoniaque (Letellier, *Bull. Soc. Linn. Normandie*, 1888, p. 171, ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1889, p. 151).

487. Encre de Chine (Taguchi, *Arch. f. mik. Anat.*, 1888, p. 565).

Digitized by Google

— Encre de Chine, ou encre japonaise, bien broyée sur une pierre à aiguiser fine jusqu'à ce qu'une goutte placée sur du papier buvard ne coule pas ni ne forme un anneau gris autour d'elle. Injecter jusqu'à ce que la préparation paraisse noire, et la jeter dans un liquide durcissant (pas dans l'eau). Je pense que ce procédé sera souvent fort commode pour l'injection d'Invertébrés.

488. Carmin (Emery, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 1881, p. 21). — On prend une solution ammoniacale de carmin à 10 p. 100, à laquelle on ajoute de l'acide acétique jusqu'à ce qu'elle passe à une couleur rouge de sang. On la décante et on l'injecte telle quelle. Les pièces injectées sont mises dans de l'alcool fort, qui fixe le carmin.

Pour injections de Poissons.

489. Injection rouge (Brucke, *Arch. f. mik. Anat.*, 1886, p. 91). — Injection d'une solution concentrée de ferrocyanure de potassium suivie par l'injection d'une solution concentrée de sulfate de cuivre (qui ne doit pas contenir de fer). Laisser les pièces vingt-quatre heures avant de les préparer. Il n'y a pas d'inconvénient à cela, ces liquides étant de puissants antiseptiques.

MASSES AU COLLODION

490. Masses à la celloïdine (Schiefferdecker, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1882, p. 201). — Ces masses trouvent leur emploi principal pour les préparations par corrosion ; mais elles donnent aussi de bons résultats pour les injections ordinaires. Elles ont surtout l'avantage de conserver très bien la forme des vaisseaux.

Les seringues doivent être bien nettoyées de toute graisse. On remplit la canule d'éther. Il faut pousser l'injection rapidement, car la masse se prend vite par le contact des tissus aqueux. On nettoie les seringues et les canules avec de l'éther.

Pour faire la corrosion des pièces injectées, on les jette dans de l'acide chlorhydrique, et on les y laisse, en renouvelant de temps à autre l'acide si cela paraît nécessaire, jusqu'à ce que les tissus soient détruits. On lave sous un robinet d'eau pendant plusieurs semaines et l'on monte dans la glycérine ou dans le liquide de Calberla.

1. *Celloïdine à l'asphalte.* — On pulvérise de l'asphalte dans un mortier, et on le laisse macérer avec de l'éther dans un récipient bien fermé, pendant vingt-quatre heures. Puis on décante la solution et l'on y fait dissoudre de la celloïdine en petits morceaux jusqu'à consistance d'huile. C'est la meilleure de ces masses.

2. *Celloïdine à la vésuvine.* — On fait une solution concentrée de vésuvine dans l'alcool absolu, et l'on y fait dissoudre de la celloïdine. La couleur n'est pas durable.

3. *Celloïdine bleu foncé.* — A une solution de celloïdine dans un mélange

Digitized by Google

à parties égales d'éther et d'alcool absolu on ajoute du bleu de Berlin pulvérisé.

4. *Celloïdine rouge foncé.* — Comme le mélange précédent, le cinabre pulvérisé étant employé à la place du bleu de Berlin. Ces deux couleurs doivent être broyées dans un mortier avec un peu d'alcool absolu, de manière à former une pâte que l'on ajoute à la solution de celloïdine. Il faut éviter d'employer une trop grande quantité de ces couleurs, sous peine de voir la masse devenir fragile. On peut passer la masse à travers une chausse de flanelle saturée d'éther.

AUTRES MASSES

491. Asphalte à la benzine (Rudge, *Arch. f. mik. Anat.*, 1877, p. 70). — On verse de la benzine sur de l'asphalte, dont il faut prendre une quantité considérable, et on laisse reposer plusieurs jours. Avant d'injecter, on ajoute 1/3 à 1/2 volume de benzine et l'on filtre. On peut aussi employer le chloroforme ou l'essence de térébenthine comme dissolvant.

Pour l'injection des canalicules du cartilage par piqûre, ou autrement.

492. Gomme-laque (Hoyer, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 645). — On met une certaine quantité de gomme-laque dans un flacon à large goulot et l'on ajoute assez d'alcool à 80 p. 100 environ pour la couvrir. On laisse pendant vingt-quatre heures et l'on chauffe au bain-marie jusqu'à dissolution complète. Après refroidissement, on allonge avec de l'alcool, si cela paraît nécessaire, et l'on passe à travers de la mousseline. On colore la masse avec des couleurs à l'aniline en solution alcoolique concentrée, ou avec des matières colorantes granuleuses suspendues dans l'alcool.

Cette masse n'est pas attaquée par l'acide chlorhydrique, par suite elle est applicable aux préparations par voie de corrosion.

493. Autres masses. Couleurs à l'huile. Térébenthine. Cire à cacheter. — Voyez Robin, *Traité*, p. 23. — **Empois d'amidon** (Pansch). — Pour cette masse, d'un emploi plutôt macroscopique, voyez *Arch. f. Anat. u. Entw.*, 1877, p. 480-2; 1881, p. 76; 1880, p. 232, 371; 1882, p. 60; 1883, p. 265. — **Masses à l'huile de lin** (Teichmann). — Voyez *S. B. Math. Kl. Krakau Akad.*, VII, p. 108, 158; et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1882, p. 125 et 716. — **Axonge. Blanc de baleine.** — Voyez Robin, *Traité*, p. 23. — **Cire et huile.** — Voyez Griesbach, *Arch. f. mik. Anat.*, 1882, p. 824-7.

494. Injections naturelles (Robin, *Traité*, p. 6). — Pour conserver les organes injectés naturellement par stase sanguine. Robin conseille de les jeter dans un liquide composé de :

Perchlorure de fer liquide	10 parties.
Eau	100 —

Retterer (*Journ. de l'Anat.*, XXX, 1894, p. 336) emploie la solution de Müller, et y laisse les objets pendant vingt-quatre heures, fait des coupes à la paraffine et colore dans le mélange Ehrlich-Bioudi.

Digitized by Google

CHAPITRE XXIII

MACÉRATIONS ET CORROSIONS, DIGESTION

DÉCALCIFICATION, DÉSILICIFICATION ET DÉPIGMENTATION

495. Procédés de macération. — Pour faciliter la dissociation des éléments histologiques, il y a souvent utilité à traiter les tissus par des agents « macérateurs ». Ce sont des réactifs qui ont la propriété de ramollir et même de détruire entièrement certains éléments — généralement les substances intercellulaires — tout en maintenant l'intégrité des formes des éléments qu'on désire isoler pour l'étude. Les tissus ayant été exposés à l'action d'un agent macérateur approprié, on achève la dissociation par des moyens mécaniques. On dilacère avec des aiguilles ; ou l'on agite les pièces dans une éprouvette avec un peu de liquide ; ou bien on met en œuvre le procédé de désagrégation par chocs répétés. A cette fin, on met sur un porte-objet la portion de tissu à dissocier, dans une goutte de liquide, et on le couvre d'une lamelle soutenue par quatre petits pieds formés de boulettes de cire molle ou d'un mélange de cire et de térébenthine. En frappant à petits coups secs sur la lamelle, on amène à la longue, quelquefois même assez rapidement, la désagrégation des tissus. Cette méthode, si simple en apparence, est souvent plus efficace qu'aucune autre.

496. Sérum iodé. — Nous avons donné la préparation de ce réactif au numéro 353. Voici les instructions de Ranvier sur la manière de l'employer pour les macérations.

On prend un fragment de tissu d'un volume inférieur à celui d'un pois, et on le place dans un flacon bien bouché avec 4 ou 5 cc. de sérum faiblement iodé ; généralement dès le lendemain on peut pra-

Digitized by Google

tiquer la dissociation par l'un des moyens indiqués plus haut. Si le tissu n'est pas encore suffisamment macéré, il faut prolonger son séjour dans le sérum ; mais on remarquera que, dès le second jour, le sérum est tout à fait décoloré, c'est-à-dire que le tissu a absorbé tout l'iode qu'il contenait, et, si on laissait les choses en cet état, la putréfaction ne tarderait pas à survenir. Pour l'empêcher, on ajoute quelques gouttes de sérum fortement iodé (voy. numéro 353) jusqu'à ce que le liquide ait repris une légère coloration brune. Le séjour du tissu dans le sérum peut ainsi être prolongé pendant plusieurs semaines, si l'on ajoute du sérum iodé chaque fois que le liquide se décolore. C'est l'addition successive de nouvelles quantités d'iode qui constitue la clef de cette méthode de macération.

497. Sérum iodé artificiel (Frey). Voyez numéro 354. — Ranvier trouve que cette formule ne fournit pas un sérum utile pour les macérations.

498. Alcool dilué. — On peut se servir de diverses concentrations d'alcool, depuis un mélange de 1 partie d'alcool avec 3 d'eau (Thin, pour l'isolation des fibrilles nerveuses de la rétine), jusqu'à l'alcool à 50 p. 100. Mais le plus utile de ces alcools est sans contredit l'*alcool au tiers* de Ranvier (*Traité*, p. 77). C'est un mélange de 1 partie d'alcool à 36° (90 p. 100) et de 2 parties d'eau. Ce mélange macère plus rapidement que le sérum iodé. La plupart des épithéliums s'y macèrent bien en vingt-quatre heures.

De l'avis de tous les observateurs, l'alcool au tiers est un macérateur doux de premier ordre. List (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 511) trouve qu'il ne doit être employé qu'avec précaution pour l'isolation de cellules glandulaires, à cause des gonflements qu'il y produit ; et il pense que le liquide de Müller ou l'acide osmique est préférable pour ce genre d'objets.

499. Chlorure de sodium. — La solution à 10 p. 100 de chlorure de sodium est un agent de macération très employé et très efficace.

500. Chlorure de sodium et alcool (Moleschott et Piso Borme, *Moleschott's Untersuchungen z. Naturl.*, XI, p. 99-107 ; Ranvier, *Traité*, p. 242).

Chlorure de sodium à 10 p. 100	5 volumes.
Alcool absolu.	1 —

Ce mélange fut particulièrement recommandé par les auteurs cités

Digitized by Google

en premier lieu pour l'étude des cellules à cils vibratiles. Ranvier le trouve inférieur à l'alcool au tiers.

501. Hydrate de chloral. — En solution pas trop forte, de 2 à 5 p. 100 environ, l'hydrate de chloral est un macérateur doux très recommandable parce qu'il conserve on ne peut mieux les éléments délicats. LAVDOWSKY (*Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 359) le recommande beaucoup pour les glandes salivaires. HICKSON le recommande pour la rétine des Arthropodes (*Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1885, p. 244).

502. Potasse caustique ou **soude caustique** (RANVIER, *Traité*, p. 78). — Ces alcalis servent à procurer très rapidement des préparations fugitives qui ne se laissent conserver que très peu de temps. On les emploie en solutions *fortes*, de 35 à 50 p. 100 (MOLESCHOTT) ; à ces degrés de concentration ils ne modifient que légèrement les cellules, tandis qu'à des doses faibles ils détruisent tous les éléments. On emploie cependant des solutions faibles pour dissocier les éléments des ongles, des poils et de l'épiderme. Les solutions fortes s'emploient en les faisant agir sur le tissu étalé sur le porte-objet.

503. Salive artificielle (CALBERLA, *Arch. f. mik. Anat.*, 1875, p. 449). — Après avoir essayé plusieurs réactifs dans le but d'obtenir la dissociation du tissu musculaire et nerveux embryonnaire d'Amphibiens et d'Ophidiens, Calberla trouva que les meilleurs résultats furent donnés par le mélange de salive et de liquide de Müller employé par Czerny. Cela le conduisit à imaginer la salive artificielle dont nous allons donner la formule. (Nous supprimons la première des deux formules données par Calberla, la deuxième étant beaucoup moins compliquée et donnant des résultats tout aussi bons.)

Chlorure de potassium	0 gr. 4
Chlorure de sodium	0 — 3
Phosphate de soude.	0 — 2
Chlorure de calcium	0 — 2

On fait dissoudre ces ingrédients dans 100 parties d'eau. Puis on fait passer de l'acide carbonique à travers la solution jusqu'à saturation. On ajoute à cette solution un demi-volume de solution de Müller (ou de solution de chromate d'ammoniaque à 2,5 p. 100) et un volume d'eau.

On fait macérer les embryons dans ce mélange pendant un ou deux jours. On achève la dissociation par la dilacération et l'agitation dans un flacon, et l'on monte les pièces dans l'acétate de potasse.

Calberla a toujours eu les meilleurs résultats alors qu'il saturait le mélange d'acide carbonique au moment même de s'en servir.

504. Mélange de Landois (LANDOIS, *Arch. f. mik. Anat.*, 1885, p. 445).

Solution saturée de chromate neutre d'ammoniaque.	5 parties.
Solution saturée de phosphate de potasse	5 —
Solution saturée de sulfate de soude	5 —
Eau distillée	100 —

Digitized by Google

GIERKE, d'après qui nous citons cette formule, recommande particulièrement ce liquide pour toutes sortes de macérations, mais surtout pour le système nerveux central, pour lequel il lui donne la préférence sur tous les autres liquides macérateurs. Il s'emploie de la même manière que l'acide chromique ; de petits fragments du tissu à dissocier sont mis à macérer pendant un à trois, ou même quatre et cinq jours dans le liquide, puis mis pendant vingt-quatre heures dans du carmin ammoniacal allongé d'un volume du liquide macérateur, NANSEN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 2, 1888, p. 242) le recommande également pour le même objet.

505. Permanganate de potasse. — C'est un agent macérateur très énergique. Son action ressemble à celle de l'acide osmique, si ce n'est que nous doutons qu'il puisse fournir des préparations permanentes conservant les caractères des cellules. ROLLETT (*Stricker's Handb.*, p. 1108) le recommande, soit seul, soit combiné à l'alun, comme le meilleur réactif pour la dissociation des fibres de la cornée.

506. Bichromate de potasse. — Solution à 0,2 p. 100 environ. *La solution de* MÜLLER s'emploie à la même concentration.

507. Acide chromique. — S'emploie généralement à des doses beaucoup plus faibles, 0,02 p. 100 environ. « Il est bon pour la plupart des tissus de l'organisme, et en particulier pour les cellules nerveuses. Il en faut prendre 10 cc. pour un fragment d'environ 5 millimètres de côté. Au bout de vingt-quatre heures de séjour dans ce liquide, le tissu nerveux se dissocie avec facilité. » (RANVIER, *Traité*, p. 78.)

508. Mélange de Brock (*Intern. Monatschr.*, I, 1884, p. 349). — Parties égales de bichromate de potasse à 10 p. 100 et du liquide viscéral de l'animal (système nerveux de Mollusques).

509. Mélanges de Mœbius (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 8, 1886, p. 402). — *A*. Une partie d'eau de mer avec 4 à 6 parties de solution de bichromate de potasse à 0,5 p. 100.

B. Acide chromique, 0,25 p. 100 ; acide osmique, 0,1 p. 100 ; acide acétique, 0,1 p. 100 dans l'eau de mer. Pour les Lamellibranches. Macérer pendant plusieurs jours.

510. Mélange de Gage (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, I, 1892, p. 87 et

Digitized by Google

88). — Alcool à 95 p. 100, 250 parties ; eau, 750 ; acide picrique I. Surtout pour les épithéliums et le tissu musculaire.

511. Acide osmique. — S'emploie en solutions d'une concentration de 0,1 p. 100 ou moins, qu'on laisse agir selon les cas depuis quelques minutes jusqu'à quinze jours (écorce du cerveau du Bœuf) (RINDFLEISCH).

512. Liquide des Hertwig (HERTWIG, *Nervens. u. Sinnesorg. d. Medusen*, p. 4).

Acide osmique à 0,05 p. 100.	1 partie.
Acide acétique à 0,2 p. 100	1 —

Pour les *Méduses*. On les traite avec ce mélange pendant deux ou trois minutes, selon leur grosseur ; puis on les lave à l'acide acétique à 0,1 p. 100 souvent renouvelé jusqu'à ce qu'on ait éloigné les dernières traces d'osmium. On les laisse ensuite pendant un jour dans l'acide acétique de la même concentration, on les lave à l'eau, et on colore au carmin de Beale, qui a pour effet de prévenir le noircissement des pièces par l'osmium. On conserve les pièces dans la glycérine.

Pour les *Actinies*, la formule doit être modifiée (*Jen. Zeitschr.*, 1879, p. 457) :

Acide osmique 0,04 p. 100 dans l'eau de mer .	1 partie.
Acide acétique 0,2 p. 100..	1 —

et l'acide acétique doit être pris plus concentré pour le lavage, à savoir, 0,2 p. 100. Si la macération se montre complète, on colore avec le picro-carmin ; sinon, avec le carmin de Beale.

Ces méthodes sont très importantes pour l'étude des Cœlentérés.

513. Acide acétique et glycérine (BÉLA HALLER, *Morphol. Jahrb.*, XI, p. 321).

Acide acétique cristallisable	1 partie.
Glycérine	1 —
Eau.	2 —

Ce mélange est particulièrement recommandé par Haller pour la macération des centres nerveux des Mollusques (Rhipidoglosses). On obtient une macération suffisante en trente à quarante minutes, et cela sans que les éléments aient souffert le ratatinement produit par les autres agents macérateurs.

Digitized by Google

514. Acide nitrique. — S'emploie à une concentration de 20 p. 100 pour la macération du tissu musculaire. Après une macération de vingt-quatre heures dans ce liquide, on parvient en général à dissocier les fibres musculaires en agitant une portion du tissu avec de l'eau dans une éprouvette. Les préparations peuvent être conservées longtemps dans une forte solution d'alun (Hopkins, *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, I, 1892, p. 86), à laquelle on peut peut ajouter 2 p. 100 d'hydrate de choral (*Ref. Hand. Med. Sci.*, Supp., p. 436). La macération est grandement activée par la chaleur.

515. Acide nitrique et chlorate de potasse (Kühne : dans Ranvier, *Traité*, p. 79). — On fait dans un verre de montre un mélange de chlorate de potasse avec 4 fois son volume d'acide nitrique ; on y enfouit un fragment de tissu musculaire frais ; après une demi-heure on le retire et on l'agite dans un tube avec de l'eau.

516. Acide sulfurique (Ranvier, *Traité*, p. 78). — « Concentré et à chaud, ce réactif peut être employé pour isoler les cellules des parties cornées, des poils, des ongles, etc. Pour isoler les fibres du cristallin, Max Schultze place cet organe dans 30 grammes d'eau additionnée de 4 ou 5 gouttes d'acide sulfurique concentré. Au bout de vingt-quatre heures de macération, il suffit d'agiter un fragment du cristallin dans le liquide pour le voir se décomposer en ses éléments constituants. »

Odenius a trouvé ce réactif (moins de 1 p. 100, pendant une ou deux semaines) excellent pour l'étude des terminaisons nerveuses dans les *Poils tactiles*.

517. Acide oxalique. — On a employé avec fruit la macération, prolongée pendant plusieurs jours, dans une solution concentrée de cet acide, pour l'étude des terminaisons nerveuses.

518. Mélange méthylique (Schiefferdecker, *Arch. f. mik. Anat.*, XXVIII, 1886, p. 305). — Glycérine, 10 parties ; alcool méthylique, 1 partie ; eau distillée, 20 parties. Pour la rétine surtout. Les tissus doivent être parfaitement frais, et doivent macérer pendant plusieurs jours.

519. Lysol (Reinke, *Anat. Anz.*, VIII, 1892, n° 16, p. 582 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 224). — Solution de lysol à 10 p. 100 dans l'eau distillée ou dans l'eau additionnée d'alcool et de glycérine. (Le lysol est un produit industriel consistant en une solu-

Digitized by Google

tion de crésol dans du savon neutre, employé comme antiseptique.) Cette substance aurait surtout, d'après REINKE, la propriété d'exercer une action macératrice extrêmement rapide. Des queues de zoospermes de Rat se résolvent en fibrilles en quelques minutes. Les cellules corticales des cheveux se fibrillent en quelques minutes. Les cellules épithéliales de la Salamandre se dissocient momentanément. La chromatine des noyaux est détruite, mettant en évidence le caryoplasme réticulé. REINKE a fondé sur cette réaction des conclusions concernant la structure des noyaux qui vont loin (*Arch. f. mik. Anat.*, 43, 3, 1894, p. 398 et seq.).

LIQUIDES DIGESTIFS ARTIFICIELS

520. Liquide digestif de Beale (BEALE, *Arch. of Medicine*, I, p. 269-316). — On exprime sur des lames de verre le contenu des glandes stomacales du Porc, et on l'y fait sécher rapidement. On le réduit en poudre et on le conserve dans des flacons bouchés. 8 décigrammes de la poudre suffisent à digérer entièrement 100 grammes de blanc d'œuf coagulé.

Pour s'en servir, on fait une solution dans l'eau et l'on filtre. On combine cette solution avec de la glycérine (acidulée au besoin avec une trace d'acide chlorhydrique), et l'on fait digérer le tissu pendant quelques heures à une température de 37°,5 C.

521. Liquide de Brücke (nous empruntons la formule à CARNOY, *Biologie Cell.*, p. 94).

Extrait glycériné d'estomac de porc.	1 volume.
Acide chlorhydrique à 0.2 p. 100	3 —
Thymol.	quelques cristaux.

522. Liquide de Bickfalvi (BICKFALVI, *Centralb. f. d. Med. Wiss.*, 1883, p. 833 ; *Zool. Jahresb. f.* 1883, p. 25). — On mêle 1 gramme de muqueuse stomacale desséchée avec 20 cc. d'acide chlorhydrique à 0,5 p. 100, et on le met dans un incubateur pendant trois à quatre heures. On filtre. On fait macérer le tissu dans le liquide pendant une demi-heure à une heure au plus.

523. Liquide de Kuskow (*Arch. f. mik. Anat.*, XXX, p. 32 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 384). — Une partie de pepsine dissoute dans 200 parties de solution d'acide oxalique à 3 p. 100. La solution doit être fraîchement préparée et les objets (coupes de ligamen-

Digitized by Google

tum nuclæ durci) doivent y rester à la température ordinaire de dix à quarante minutes.

524. Liquide de Schiefferdecker (*Ibid.*, III, 4, 1886, p. 483). — Pancréatine dissoute à saturation à froid dans l'eau et filtrée. Des portions d'épiderme doivent y être macérées pendant trois à quatre heures à une température de 37° C. environ.

525. Trypsine de Kühne (*Unters. a. d. Phys. Inst. Univ. Heidelberg*, I, 2, 1877, p. 219). — Très compliqué, et d'après Rawitz (*Leitfaden*, 1895, p. 10) ne donnant pas de très bons résultats.

526. Méthodes de Gedoelst. — Voyez *La Cellule*, III, 1887, p. 117, et V, 1889, p. 126.

CORROSION

527. Potasse caustique. Soude caustique. Acide nitrique. — Un moyen très efficace pour séparer les parties molles des parties du squelette qu'on désire étudier à part (appendices des Arthropodes, spicules d'Éponges ou d'Échinodermes, etc.) consiste à les faire bouillir ou macérer pendant un temps prolongé, dans une solution concentrée d'un de ces réactifs.

528. Eau de Javelle. Eau de Labarraque. — Noll (*Zool. Anzeig.*, 1882, p. 528) recommande l'eau de Javelle (solution d'hypochlorite de potasse) pour la corrosion des parties molles des Eponges. On en ajoute quelques gouttes à une portion d'éponge sur le porte-objet. Les parties molles sont détruites au bout de vingt à trente minutes. On traite la préparation avec de l'acide acétique, pour éloigner les précipités qui peuvent s'être formés, et l'on passe par des alcools successifs à l'essence de girofle et au baume.

Looss (*Zool. Anzeig.*, 1885, p. 333) trouve que l'eau de Javelle ou bien l'eau de Labarraque (solution d'hypochlorite de soude) suffit à dissoudre complètement la chitine en peu de temps à l'aide de la chaleur. A cet effet, il faut employer les solutions commerciales concentrées et bouillantes.

Si l'on prend des solutions allongées avec 4 à 6 volumes d'eau, et que l'on y fasse macérer des organes chitineux pendant vingt-quatre heures ou plus selon leur grosseur, la chitine n'est pas dissoute, mais devient transparente, molle, et perméable par les solutions colo-

Digitized by Google

rantes, aqueuses aussi bien qu'alcooliques. Les structures les plus délicates, telles que les terminaisons nerveuses, ne sont pas altérées par ce traitement, selon Looss. On peut avantageusement traiter de cette manière les Nématodes et leurs œufs (objet dont la résistance est bien connue).

On a prétendu que l'eau de Javelle peut être appliquée à la préparation de pièces calcaires. Nons sommes convaincus que pour peu que le calcaire soit délicat, il doit s'y dissoudre.

529. Méthode de préparation par corrosion (ALTMANN, *Arch. f. mik. Anat.*, 1879, p. 471). — Les corps gras, et surtout les corps gras qui ont été durcis par l'osmium, résistent beaucoup plus longtemps que les autres éléments des tissus à l'action de l'eau de Javelle. Si donc on introduit un corps gras dans les tissus, par injection ou par imbibition, qu'on le durcisse par l'acide osmique, et qu'on soumette ensuite les tissus à la corrosion par l'eau de Javelle, on obtient, après destruction des tissus, une reproduction en graisse noircie des espaces dans lesquels on l'avait introduite.

On comprendra facilement l'application de ce principe aux injections. On injecte de l'huile d'olive ; on durcit l'huile en jetant la pièce dans l'acide osmique à 1 p. 100 ; on traite ensuite la pièce par l'eau de Javelle ; et les parties molles ayant étant détruites, on lave la préparation à la glycérine et on la monte dans le même milieu. Nous renvoyons à l'article cité pour les détails du mode opératoire pour la préparation d'injections de l'iris, de la choroïde, de la peau, du mésentère, des corpuscules de la cornée, etc., de la Grenouille et d'autres animaux. Le procédé se montre surtout d'un bon secours pour l'injection d'organes très pigmentés.

On trouvera un excellent abrégé de ce travail avec planche dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1879, p. 610.

DÉCALCIFICATION

530. Emploi des décalcifiants. — Pour avoir les meilleurs résultats il est important de n'employer que du matériel qui a été *bien fixé et durci secundum artem*, et il ne faut pas avoir trop de confiance en les réactifs qui sont réputés durcir et décalcifier en même temps du matériel frais (FISH, *Ref. Handb. Med. Sci. Supp.* p. 425).

531. Réactifs décalcifiants. — Nous empruntons le résumé suivant à l'article de BUSCH sur la Technique de l'Histologie du Tissu Osseux dans *Arch. f. mik. Anat.*, 1877, p. 481.

Le réactif le plus employé pour la décalcification est l'*acide chlorhydrique*. Son action est très rapide, même quand on le prend très dilué, mais il a l'inconvénient de causer des gonflements très sérieux

Digitized by Google

dans les tissus. Pour parer à cet inconvénient, on peut le combiner à l'alcool, ou à l'acide chromique. Ou bien on peut prendre une solution à 3 p. 100 et y faire dissoudre 10 à 15 p. 100 de sel de cuisine. Ou bien (WALDEYER) on peut employer une solution de 10 p. 100 avec 0,1 p. 100 de chlorure de palladium.

L'*acide chromique* est également très employé. Il a les deux inconvénients d'avoir une action très lente et de ratatiner fortement les tissus. Pour cette raison on ne doit jamais l'employer en solutions de plus de 1 p. 100, et pour des structures délicates on doit prendre des solutions beaucoup plus faibles.

L'*acide phosphorique* a été recommandé pour des os jeunes.

Les *acides acétique*, *lactique* et *pyroligneux* ont une action assez énergique, mais ils causent des gonflements sérieux.

L'*acide picrique* a une action très lente, et n'est propre que pour de très petits objets.

L'*acide nitrique* est, selon BUSCH, préférable à tous ces réactifs. Il agit d'une manière efficace, ne produit pas de gonflements, et n'altère pas les éléments des tissus.

532. Acide nitrique (BUSCH, *loc. cit.*). — On allonge 1 volume d'acide nitrique pur, de la densité de 1,25, avec 10 volumes d'eau. C'est cette concentration qu'on emploie pour les os volumineux et durs ; pour les os jeunes, il est bon de l'allonger encore jusqu'à 1 p. 100.

On procède ainsi : on met les os d'abord pendant trois jours dans l'alcool à 95° ; puis on les met dans l'acide nitrique, qui doit être renouvelé tous les jours, pendant huit à dix jours. Il faut les sortir de l'acide aussitôt que la décalcification est complète, autrement ils seront jaunis. On les lave pendant une heure ou deux dans un courant d'eau et on les met dans l'alcool à 95° qu'on renouvelle après quelques jours.

Les os jeunes et fœtaux doivent être mis en premier lieu dans une solution contenant 1 p. 100 de bichromate de potasse et 0,1 p. 100 d'acide chromique ; on les décalcifie ensuite avec de l'acide nitrique de 1 à 2 p. 100, auquel on peut ajouter un peu d'acide chromique (0,1 p. 100) ou de chromate de potasse (1 p. 100). En les mettant ensuite dans l'alcool on obtient la coloration verte connue.

533. Acide nitrique et alcool. — 3 p. 100 d'acide nitrique dans l'alcool à 70°. Il faut laisser macérer dans ce liquide pendant quelques jours à quelques semaines. Nous ne savons qui a recommandé ce

Digitized by Google

mélange. C'est un réactif important. En effet, l'acide nitrique exerce facilement, même dans les solutions faibles, une action gélatinisante sur le tissu osseux : l'addition d'alcool (*ou d'alun*) *sert à ralentir cette action.* (Fish, dans *Ref. Handb. Med. Sci.*, Supp., p. 245.)

534. Acide nitrique et alun (Gage, cité d'après Fish, *loc. cit.*). — Solution saturée d'alun allongée de moitié d'eau et additionnée de 5 p. 100 d'acide nitrique. Changer tous les deux ou trois jours. Pour le tissu dentaire ce mélange donnerait de meilleurs résultats que le mélange alcoolique.

535. Acide chromo-nitrique. — 1° Mélange de Marsh.

Acide chromique cristallisé	1	partie.
Acide nitrique	2	—
Eau.	225	—

Faire macérer pendant trois à quatre semaines dans cette solution, souvent renouvelée.

2° Mélange de Fol (*Lehrb.*, p. 112).

Solution d'acide chromique à 1 p. 100 . .	70	volumes.
Acide nitrique	3	—
Eau.	200	—

3° Fish (*Journ. of Morphol.*, X, 1, 1895, p. 234,) prend simplement le liquide de Perenyi (n° 51).

536. Acide chromique. — Pur, cet acide s'emploie à des concentrations de 0,1 à 1 p. 100. Il est bon de prendre les solutions faibles d'abord, et d'en augmenter peu à peu la concentration. Il faut faire macérer les os pendant deux à trois semaines.

537. Acide chromo-chlorhydrique (Bayerl, *Arch. f. mik. Anat.*, 1885, p. 35).

Solution d'acide chromique à 3 p. 100	1	partie.
Acide chlorhydrique à 1 p. 100	1	—

Pour le cartilage en voie d'ossification.

538. Acide chlorhydrique. — Pur, on peut le prendre d'une concentration de 50 p. 100 ; il a alors une action extrêmement rapide (Ranvier).

Digitized by Google

539. Acide picrique. — Solution saturée.

Nous avertissons que l'*acide picro-sulfurique* doit être évité pour les décalcifications, parce qu'il donne lieu à la formation de sulfate de chaux. On peut employer cependant l'acide picro-nitrique, ou l'acide picro-chlorhydrique.

540. Phloroglucine (ANDEER, *Centralbl. f. d. med. Wiss.*, n. 12, 33, p. 193, 579; *Intern. Monatsch.*, I, p. 350; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 375, 539). — Andeer recommande un mélange de phloroglucine avec de l'acide chlorhydrique. Il prend pour des os de Batraciens, 5 à 10 p. 100 d'acide; pour des Chéloniens et des Oiseaux, 10 à 20 p. 100; pour des Mammifères, 20 à 40 p. 100. Dans ces mélanges les os sont décalcifiés en peu d'heures. Ils y deviennent si tendres qu'il est nécessaire de les durcir par la suite.

HAUG (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 1, 1891, p. 8) explique que la phloroglucine n'agit pas en elle-même comme dissolvant des sels calcaires; son rôle dans les mélanges est de protéger de telle façon les éléments des tissus contre l'action des acides minéraux que ceux-ci peuvent être employés à des doses plus fortes qu'on ne pourrait le faire sans cette adjonction. HAUG recommande la marche suivante :

1 gramme de phloroglucine est ajouté à 10 cc. d'acide nitrique pur (pas fumant, densité 1,4). On chauffe très graduellement tout en agitant doucement. Il se forme une solution (vraisemblablement de nitrate de phloroglucine). On allonge cette solution de 100 cc. d'eau et on ajoute 10 cc. d'acide nitrique. On obtient ainsi une solution contenant 20 p. 100 d'acide, ce qui est la bonne dose. (On peut allonger d'eau jusqu'à avoir en tout 300 cc., si l'on ajoute en même temps la proportion voulue d'acide, mais il ne faut pas dépasser ce point sous peine de voir diminuer l'action protectrice de la phloroglucine.)

La marche de la décalcification dans ce mélange est extrêmement rapide et doit être surveillée. Des os fœtaux ou jeunes deviennent tout à fait tendres *en une demi-heure;* de petits morceaux d'os vieux et durs (tels que le fémur, le temporal) le deviennent en quelques heures. Les dents demandent plus de temps. Si l'on est pressé, on peut employer pour ce tissu une solution contenant 35 à 45 p. 100 d'acide nitrique.

Après décalcification on lave pendant deux jours à l'eau courante.

On peut également faire la solution avec de l'acide chlorhydrique au lieu d'acide nitrique. On prend alors 30 p. 100 d'acide, et l'on ajoute 0,5 p. 100 de chlorure de sodium.

Veut-on une décalcification lente, on peut prendre ou bien une

Digitized by Google

solution contenant seulement 2 à 5 p. 100 d'acide nitrique ; ou bien un mélange contenant une partie de phloroglucine, 5 d'acide nitrique, 70 d'alcool, et 30 d'eau distillée.

DÉSILICIFICATION

541. Acide fluorhydrique (MAYER, *Zool. Anzeig.*, 1881, p. 593). — On met les objets à désilicifier dans un récipient de verre enduit de paraffine. On ajoute de l'acide fluorhydrique goutte à goutte, en veillant soigneusement à ne pas s'exposer à ses vapeurs. De petits fragments d'éponges siliceuses peuvent être désilicifiés en quelques heures, une *Wagnerella borealis* en quelques minutes. Les tissus ne sont pas endommagés.

Nous pensons que personne n'entreprendra cette opération si dangereuse à moins de nécessité absolue. Des éponges siliceuses peuvent très bien être coupées au microtome sans désilicification ; les spicules se brisent devant le couteau.

DÉPIGMENTATION ; BLANCHIMENT

542. Emploi du chlore (MAYER, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 1881, p. 8). — On met les objets à décolorer dans l'alcool de 70 à 90°. On ajoute assez de fragments de chlorate de potasse pour couvrir le fond du flacon. On ajoute avec une pipette quelques gouttes d'acide chlorhydrique; il se dégage bientôt du chlore, reconnaissable à sa couleur verte ; on agite alors le mélange et l'on chauffe si le dégagement de chlore n'est pas suffisamment énergique. La plupart des objets peuvent cependant être décolorés en une demi-journée sans l'application de la chaleur. Les tissus ne souffrent nullement.

Au lieu d'acide chlorhydrique, on peut employer l'acide nitrique; en ce cas l'agent décolorant est l'oxygène au lieu du chlore.

La méthode de décoloration par le chlore fut imaginée pour blanchir des préparations qui ont été noircies par l'action excessive de l'osmium ; on peut l'appliquer à la décoloration d'organes pigmentés (yeux d'Insectes, etc.).

543. Emploi du chlore (MARSH, *Section Cutting*, p. 89). — Marsh fait dégager du chlore dans un flacon en traitant des cristaux de chlorate de potasse avec de l'acide chlorhydrique fort, et conduit le gaz à travers un tube de verre courbé deux fois à angle droit jusqu'au fond d'un autre flacon contenant les objets à décolorer.

Digitized by Google

544. Eau de chlore (SARGENT, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 151).

Chlorate de potasse	1 gr. 5
Eau	28 cc.
Acide chlorhydrique	X gouttes.

Faire macérer dans cette solution pendant un ou deux jours. Nous faisons observer que ce procédé n'est applicable qu'à la préparation de parties de squelette, les tissus mous étant détruits par ce traitement, qui ne revient guère à autre chose qu'à un blanchiment par l'eau de Javelle.

545. L'acide nitrique est connu pour avoir une action plus ou moins dissolvante sur les pigments animaux. Il faut le prendre plutôt fort, 5 à 10 p. 100, ou plus.

546. Chloroforme. — D'après SAZEPIN, le chloroforme sert à éclaircir la chitine fortement pigmentée ; en ajoutant après quelque temps une goutte d'acide nitrique concentré, on arrive à une décoloration complète. (Voyez au chapitre des *Arthropodes*.)

547. Mélange de Grenacher pour yeux d'Arthropodes et autres (GRENACHER, *Abh. nat. Ges. Hall-a-S.*, Bd. XVI ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 244).

Glycérine	1 partie.
Alcool à 80 degrés	2 —

Et pour 100 volumes de ce mélange, 1 à 3 d'acide chlorhydrique.

Le pigment se dissout dans ce liquide et forme une teinture qui, en douze à vingt-quatre heures, produit la coloration des noyaux de la préparation.

548. Créosote (POUCHET, *Journ. de l'Anat.*, 1876, p. 8 et suiv.). — D'après le mémoire que nous citons, il paraît que la plupart des pigments animaux granuleux sont solubles dans la créosote.

549. Eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) (POUCHET, *Précis* de M. DUVAL, p. 234). — L'eau oxygénée est un décolorant assez énergique. Pouchet conseille de faire macérer les pièces dans la glycérine additionnée d'eau oxygénée (5 ou 6 gouttes pour un verre de montre de glycérine).

On peut souvent se procurer de l'eau oxygénée chez les coiffeurs, qui s'en servent comme teinture pour les cheveux, et en vendent sous le nom d' « Auréoline », etc.

Digitized by Google

Nous avons indiqué au numéro 40 le procédé d'OVERTON pour le blanchiment de tissus noircis par l'osmium.

550. Peroxyde de sodium (CARAZZI, *Zool. Anz.*, 444, 1894, p. 135). — Le peroxyde de sodium, Na^2O^2, est une poudre jaunâtre qui au contact de l'eau pure dégage de l'oxygène et donne à l'eau une réaction alcaline. Avec l'eau acidifiée cette alcalinité du liquide ne se produit pas. CARAZZI recommande de mettre une solution d'acide tartrique ou acétique à 10 p. 100 dans un récipient convenable, puis de mettre sur le fond du récipient une *petite* quantité de peroxyde, puis d'ajouter avec précaution de l'alcool (à 70 p. 100) à la surface du liquide, et de mettre dans cet alcool les objets (préalablement imbibés eux-mêmes d'alcool). L'oxygène se dégage du fond du liquide, monte et se dissout dans l'alcool, blanchissant les objets qui s'y trouvent.

Il ne faut pas employer d'acides minéraux, et il ne faut pas ajouter de grandes quantités de peroxyde à une petite quantité de liquide, la réaction dans ces conditions étant très violente.

551. Acide sulfureux. — M. le professeur GILSON me fait observer que l'anhydride sulfureux (SO^2) en solution alcoolique est un réactif très commode pour décolorer les pièces fixées par le bichromate. Il suffit de quelques gouttes.

Digitized by Google

CHAPITRE XXIV

MÉTHODES EMBRYOLOGIQUES

552. Méthodes générales. — Il n'existe pour ainsi dire pas de méthodes embryologiques spéciales, et la plupart des méthodes générales qui ont été exposées dans la première partie de cet ouvrage sont applicables à l'étude des embryons. Nous croyons cependant devoir donner avec quelques détails les modes de préparation et d'étude d'un certain nombre d'embryons, pour que ces exemples puissent servir de guide au débutant dans les recherches qu'il entreprendra.

Pour un assez grand nombre d'œufs d'animaux, surtout parmi les Invertébrés, on peut suivre, à l'état vivant, le développement sous le champ même du microscope, en examinant les œufs par transparence ou à la lumière directe. Tels sont, par exemple, les œufs de certains Poissons osseux, de l'Épinoche, de la Perche, du Macropode et de plusieurs espèces pélagiques, les œufs du *Chironomus*, de l'*Asellus aquaticus*, des Ascidies, du Planorbe, de beaucoup de Cœlentérés, etc. On devra, autant que possible, suivre les phases du développement sur les œufs vivants et dessiner les différents stades, afin d'avoir des points de repère lorsqu'on étudiera les œufs par la méthode des coupes.

Pour examiner les œufs des animaux aquatiques, il suffit de les placer sur une lame de verre dans une goutte d'eau douce ou d'eau de mer, suivant l'habitat de l'animal, et de les recouvrir d'une lamelle munie à ses angles de petites boulettes de cire à modeler, ce qui permet d'exercer une pression modérée comprimant légèrement les œufs et les maintenant en place. Souvent de simples petits morceaux de papier, d'épaisseur variable, interposés entre le porte-objet et la lamelle, suffisent pour empêcher les œufs d'être écrasés. Ce dispositif

Digitized by Google

permet de faire tourner les œufs et d'examiner leurs différentes faces, en imprimant de légers mouvements à la lamelle. Il a aussi le grand avantage de pouvoir faire arriver au contact des œufs différents réactifs dont on règle l'action à l'aide d'une petite bande de papier à filtrer placée sur le bord de la lamelle, du côté opposé à celui par lequel on fait arriver le réactif. On peut, de cette manière, obtenir des préparations permanentes d'objets délicats en les soumettant successivement aux réactifs durcissants, colorants, etc.

Lorsque les œufs sont un peu volumineux, on les placera sur une lame portant une excavation ; s'ils sont très résistants, l'emploi des compresseurs pourra rendre de grands services.

Certains œufs d'Insectes et d'Arachnides, qui sont complètement opaques quand on les examine soit à la lumière transmise, soit à la lumière directe, deviennent transparents si on les place dans une goutte d'huile ; en ayant soin de laisser leur surface simplement imprégnée d'huile, ils continuent à se développer normalement. (Méthode du professeur Balbiani.)

Les petits artifices que nous venons d'indiquer brièvement ne permettent en général d'étudier que les formes extérieures des embryons, à moins que ceux-ci ne soient très petits et très transparents, auquel cas on obtient des coupes optiques en faisant varier la mise au point du microscope. Mais il faut presque toujours en arriver à la méthode des coupes, à laquelle on doit les progrès rapides de l'embryogénie depuis quelques années. De même que pour les autres tissus, les œufs et les embryons ne peuvent être coupés qu'après avoir été convenablement fixés et durcis.

553. Fixation et durcissement. — Comme en histologie, la fixation est un point des plus importants de la technique embryologique. Nous avons déjà indiqué, dans les chapitres II, III, IV et V, les meilleurs agents fixateurs pour les embryons ; nous n'aurons donc plus qu'à mentionner dans ce chapitre quelques formules spéciales. Nous ferons cependant observer que le choix de la méthode de fixation doit dépendre de la nature et du volume de l'embryon ainsi que du genre de recherche qu'on se propose. C'est ainsi que l'acide osmique, seul ou associé à d'autres agents, fixe très bien les petits embryons, tandis qu'il ne vaut rien pour les objets plus volumineux. L'acide osmique a une tendance à diminuer le volume des éléments cellulaires, aussi fait-il nettement apparaître les fentes qui séparent les feuillets blastodermiques, les cavités et les canaux en voie de formation ; il noircit fortement les matières grasses et par conséquent

Digitized by Google

les éléments vitellins, la myéline, etc. ; cet agent fixateur rendra donc de grands services pour l'étude du développement du système nerveux.

L'acide chromique est indispensable pour l'étude de la forme extérieure des embryons ; il accuse très bien les creux et les saillies en conservant admirablement les rapports des parties, mais il a le grand inconvénient d'altérer le plus souvent les éléments cellulaires et d'empêcher leur coloration ultérieure.

Les liquides fixateurs qui ont pour base l'acide picrique, à l'inverse de l'acide osmique, gonflent légèrement les éléments et tendent à effacer les espaces qui peuvent exister entre eux ; malgré cela, l'acide picrique et principalement le liquide de Kleinenberg sont parmi les meilleurs fixateurs ceux qu'emploient de préférence les embryologistes.

Voici une formule de Rabl (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 165), que cet auteur a expérimentée longuement avec succès, pour des Vertébrés surtout, mais qu'il recommande également pour d'autres objets :

Sublimé platinique.

Chlorure de platine, 1 p. 100.	1	volume.
Sublimé, solution saturée aqueuse	1	—
Eau distillée	1	—

Pour bien des blastodermes et embryons *jeunes* (Poissons, Amphibiens, Oiseaux, Mammifères). Les embryons de Téléostéens *avancés* demandent à être fixés dans le mélange *à chaud*, pour éviter la rupture de muscles et le ratatinement de la chorda. Le sublimé picrique de Rabl a été donné au n° 68. Rabl le recommande surtout pour des embryons plutôt âgés, embryons de Poulet à partir du troisième ou quatrième jour, et pour d'autres embryons de semblables dimensions. Pour les deux, fixation de douze à quarante-huit heures, lavage deux heures dans l'eau.

Le durcissement des embryons se fait comme celui des petits animaux et des tissus délicats. On devra préférer la coloration en masse à l'aide d'un agent bien pénétrant tel que le carmin de Grenacher ou le carmin aluné acide ou par l'hémalun ou l'hémacalcium de Mayer. Comme masse à inclusion, nous avons toujours obtenu d'excellents résultats avec le collodion durci ensuite dans le chloroforme suivant la méthode de Viallanes, ou mieux avec la paraffine. Cette dernière permet la confection de coupes plus minces et plus égales, et l'emploi de l'admirable microtome à bascule de la Société des instruments de

Digitized by Google

Cambridge (*Rocking microtome*) qui nous paraît être actuellement l'instrument le plus pratique pour les embryologistes, puisqu'il permet, en quelques minutes, de débiter un embryon en un grand nombre de coupes, toutes d'égale épaisseur, et rigoureusement disposées en série continue.

554. Reconstruction de l'embryon au moyen des coupes. — Lorsqu'on veut, au moyen d'une série de coupes, reconstruire un embryon pour bien se rendre compte de sa configuration, de la forme de ses viscères, suivre le trajet d'un vaisseau, etc., on a recours à la méthode exposée par Fol dans son Traité d'anatomie microscopique comparée (*Lehrbuch der vergl. mikr. Anatomie*, p. 35).

On commence par faire un dessin de l'embryon à couper, ou par le photographier à un grossissement donné. L'embryon étant débité suivant un plan normal à celui du dessin, en coupes transversales d'égale épaisseur et disposées en série, on dessine ou on photographie les coupes au même grossissement que la vue d'ensemble de l'embryon. On trace ensuite sur le dessin d'ensemble une série de traits parallèles qui correspondent aux coupes, distants d'un millimètre, si c'est de dixième de millimètre en dixième de millimètre que l'on a recueilli les coupes et si le dessin a été grossi dix fois.

Puis, sur une plaque de verre, plus grande que le dessin d'ensemble, recouverte d'une couche de gélatine sèche, on trace une série de traits parallèles très rapprochés, avec un certain nombre d'encres colorées, employées dans le même ordre et assez variées pour que la même nuance ne revienne qu'à une certaine distance. Perpendiculairement à ces traits, on coupe la plaque de verre au diamant, en deux parties inégales.

Une de ces parties est alors appliquée sur le dessin de l'une des coupes transversales, l'autre est placée sur le dessin d'ensemble de façon que son bord coupé au diamant recouvre le trait correspondant à la coupe transversale en question : on a soin que sur les deux plaques les limites extrêmes des deux dessins correspondent aux traits colorés de même nuance; si, par exemple, le bord du dessin d'ensemble correspond sur la plaque à un trait rouge en haut et à un trait bleu en bas, il faut qu'il en soit de même pour la plaque appliquée sur le dessin de la coupe.

On calque, sur la plaque appliquée sur le dessin de la coupe, le contour des organes internes ; en rapprochant ensuite cette demi-plaque de l'autre moitié qui est sur le dessin principal, on pourra facilement marquer sur le trait du dessin principal qui correspond à la

Digitized by Google

coupe une série de points correspondant aux limites des contours des organes internes.

Quand on aura fait la même opération pour une série de coupes transversales, il n'y aura plus qu'à réunir ces points par des lignes pour avoir dans le dessin principal le tracé des organes internes vus du même côté.

Lorsqu'on veut se faire une idée exacte d'un organe de forme très compliquée, on colle les dessins ou les photographies des coupes faits au même grossissement, chacun sur un carton, dont l'épaisseur est proportionnelle à l'épaisseur de la coupe et au grossissement de la photographie ou du dessin, puis on découpe chaque carton en enlevant toutes les cavités, tant du cœlome que des organes; enfin on colle les découpures les unes sur les autres. On obtient ainsi une représentation dans l'espace de la portion de l'embryon qu'on veut étudier.

Des reconstructions peu compliquées peuvent se faire par le procédé très simple de Schaffer (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1890, p. 342). On fait les dessins sur papier à décalquer et on les superpose contre une vitre pour les regarder par transparence.

Pour des méthodes plus compliquées et rarement nécessaires, consulter Born, *Die Plattenmodellirmethode*, dans *Arch. f. mik. Anat.*, 1883, p. 591 ; Strasser, *Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 2, 1886, p. 179, et IV, 2 et 3, p. 168 et 330 ; Kastschenko, *ibid.*, 1887, IV, 2 et 3, p. 235-6 et 353, et V, 2, 1888, p. 173 (on trouvera des résumés de tous ces mémoires dans le *Journ. Roy. Mic. Soc.* des années en question).

555. Fécondations artificielles. — On éprouve souvent de grandes difficultés à se procurer les mêmes phases du développement de certains animaux ; aussi, chaque fois qu'on étudie l'embryogénie d'animaux à fécondation extérieure, est-il avantageux de pratiquer la fécondation artificielle.

Cette opération se réalise aisément pour les Amphibiens anoures, les Poissons osseux, les Cyclostomes, les Échinodermes, beaucoup de Vers et de Cœlentérés.

Pour les Amphibiens, on ouvre la femelle et le mâle, on prend dans les utérus de la femelle les œufs qu'on place dans un verre de montre ou dans un cristallisoir; on les arrose avec de l'eau dans laquelle on a dilacéré le testicule du mâle ou mieux les canaux déférents.

Les femelles des Poissons osseux laissent facilement échapper leurs œufs lorsqu'on pratique une légère pression sur l'abdomen ; il en est

Digitized by Google

de même des mâles dont on obtient la semence en exerçant une pression semblable ; mais quelquefois on devra sacrifier le mâle (Épinoche) pour prendre les testicules et les dilacérer dans l'eau. Les spermatozoïdes des Poissons, surtout ceux des Salmonides, perdant rapidement leur vitalité au contact de l'eau, on mettra la laitance sur les œufs extraits du corps de la femelle et on versera ensuite sur le tout une petite quantité d'eau ; après quelques minutes on place les œufs dans un appareil à incubation recevant de l'eau courante.

La fécondation artificielle chez les Invertébrés ne présente aucune difficulté, lorsqu'on a à sa disposition des animaux renfermant des produits sexuels arrivés à maturité. Il suffit de dilacérer dans un peu d'eau (eau douce ou eau de mer) un fragment de testicule et d'ovaire, et de mélanger les deux liquides. L'opération peut se faire sur la platine du microscope et on peut suivre la pénétration du spermatozoïde dans l'œuf, comme l'ont fait Fol, Hertwig, Selenka et d'autres chez les Échinodermes.

MAMMIFÈRES

556. Lapin. Recherche des ovules. — Nous prendrons comme type l'embryon du Lapin. Pour observer les premiers développements du Lapin, il faut rechercher les ovules dans les trompes, un certain nombre d'heures après l'accouplement. La déhiscence des follicules se fait environ dix heures après le premier coït.

Une même Lapine peut servir à faire deux observations différentes à quelques heures ou à quelques jours d'intervalle. Pour cela, on pratique sur la ligne médiane ou sur le côté de l'abdomen une incision longitudinale de 8 à 10 centimètres ; tandis qu'un aide empêche les intestins de sortir, on place une première ligature à la base de la corne utérine, au-dessus du col, puis on comprend dans une seconde ligature tout le mésométrium et le mésovarium. On détache alors, avec des ciseaux, l'ovaire, la trompe et la corne utérine. Il n'y a plus qu'à refermer l'abdomen par quelques points de suture comprenant d'abord la couche musculaire, puis la peau. Les Lapines supportent très bien cette opération, qui n'entrave nullement le développement des ovules du côté opposé. Lorsqu'on veut observer ces derniers, on sacrifie l'animal, à moins qu'on ne lui fasse subir une seconde laparotomie si on désire le garder pour des vivisections ultérieures.

La trompe et la corne utérine étant extraites de l'animal, il faut les laisser refroidir pendant quelque temps et attendre que les contractions musculaires aient cessé. Puis, à l'aide de petits ciseaux ou d'un bon scalpel, on débarrasse soigneusement toutes les circonvolutions du conduit génital de leur enveloppe péritonéale.

Digitized by Google

Si les ovules sont encore contenus dans la trompe, c'est-à-dire jusqu'à la fin du troisième jour, on étend la trompe sur une longue lame de verre et on l'ouvre longitudinalement avec une paire de ciseaux fins et coupant bien. A l'aide d'aiguilles et de bruxelles on étend la muqueuse tubaire afin d'en effacer autant que possible les plis, et on examine l'organe avec une forte loupe, ou à l'aide d'un microscope à un très faible grossissement. Lorsqu'on a trouvé les ovules, on les enlève avec la pointe d'un scalpel, avec une aiguille à cataracte, ou à l'aide d'une petite pipette, après avoir déposé sur chaque ovule une goutte de liquide indifférent. Les ovules peuvent être examinés à l'état frais, soit dans le liquide péritonéal de la Lapine, si l'animal a été sacrifié, ou dans l'humeur aqueuse de l'œil, soit dans du liquide amniotique, du sérum sanguin, du sérum artificiel, ou du liquide de Kronecker.

Quand on n'a pas réussi à trouver les ovules, à l'aide de verres grossissants, soit à la lumière directe, soit à la lumière transmise, on peut passer sur la muqueuse tubaire un petit scalpel qui enlève l'épithélium ; le produit du raclage de la muqueuse est délayé dans un peu de liquide indifférent, et on cherche les ovules à la lumière transmise.

Une autre méthode, employée par Kœlliker (*Embryologie de l'Homme et des animaux sup.*, trad. Paris, 1882), consiste à injecter dans l'oviducte, à l'aide d'une petite seringue, de la liqueur de Müller ou de l'acide osmique dilué. Le liquide est reçu dans une série de verres de montre, qui, portés sur le microscope, montrent les œufs avec facilité.

Les quatrième, cinquième et sixième jours après l'accouplement, les ovules de la Lapine sont libres dans les cornes utérines ; ils sont bien visibles à l'œil nu, et on les extrait comme de la trompe. A partir du septième jour, les ovules se fixent dans l'utérus, mais ils ne contractent pas encore d'adhérence avec la muqueuse, de sorte qu'on peut les enlever en totalité. A cette époque on distingue, à l'aspect seul de la corne utérine, les endroits où se trouvent les œufs : ceux-ci forment une saillie de la grosseur d'un petit pois. On coupe transversalement la corne utérine en autant de segments qu'il y a de renflements ovulaires, en ayant soin que chacun de ceux-ci soit au milieu de chaque segment. On fixe, au moyen de deux épingles, le segment utérin au fond d'un petit cristallisoir garni d'une couche de cire ou d'une rondelle de liège ; la face mésométriale reposant sur le fond du vase, et le renflement ovulaire étant tourné vers l'obser-

Digitized by Google

vateur. On remplit alors le vase, soit de sérum, soit de liqueur de Müller, d'une solution d'acide osmique à 1 p. 1000, de liquide de Kleinenberg, d'une solution d'acide nitrique, ou d'une solution saturée d'acétate d'urane. Avec un petit scalpel on pratique à la surface du renflement ovulaire une petite incision longitudinale qui n'intéresse que la tunique musculaire, puis avec deux petites pinces on dilacère délicatement la muqueuse utérine sous-jacente. On aperçoit alors l'œuf, et, en continuant, on le met facilement en liberté dans le liquide.

Lorsque les œufs sont greffés sur la muqueuse utérine, on ne peut plus les enlever en totalité ; l'embryon se trouvant toujours du côté de la face mésométriale, on ouvre le renflement ovulaire par une incision cruciale et on étend avec des épingles le lambeau de la muqueuse utérine, auquel l'embryon adhère, au fond du vase renfermant le liquide fixateur. En opérant ainsi dans du sérum de Kronecker, à la température du corps, Ed. van Beneden (*Archives de Biologie*, t. V, fasc. III, 1885, p. 378) a pu observer la circulation de l'embryon vivant pendant des heures entières; dans ce cas, il faut avoir soin de ne pas trop étendre l'incision cruciale, afin de ne pas intéresser le sinus terminal.

Retterer (*C. R. Soc. de Biologie*, 1887, p. 99) recommande, pour les œufs du septième jour, d'ouvrir le segment utérin renfermant l'œuf *suivant sa face mésométriale*, parce qu'il n'existe pas encore d'adhérence de ce côté. A l'aide d'une pipette, il fait pénétrer du liquide de Kleinenberg entre l'œuf et la face libre de l'utérus et il arrive ainsi à décoller l'œuf qu'il isole sous la forme d'une vésicule close.

557. Lapin, préparation. — La préparation des ovules et des embryons varie suivant le genre d'observation qu'on se propose de faire. S'agit-il de conserver d'une manière durable des ovules aux différents stades de la fécondation ou de la segmentation, Ed. van Beneden (*Archives de Biologie*, I, fasc. 1, 1880, p. 149) recommande d'opérer de la manière suivante : l'œuf vivant est porté sur un porte-objet dans une goutte d'acide osmique à 1 p. 100, puis enlevé sur la pointe d'un scalpel et placé dans le liquide de Müller. Après une heure, le liquide est renouvelé et la préparation abandonnée pendant deux ou trois jours dans une chambre humide. On ajoute alors une gouttelette de glycérine très diluée, puis de la glycérine plus pure, enfin l'ovule peut être monté dans la glycérine formique. On peut remplacer le liquide de Müller par le bichromate d'ammoniaque ou

Digitized by Google

le liquide de Kleinenberg. Si l'on veut obtenir des préparations colorées, après avoir traité l'œuf par l'acide osmique, on le place dans l'alcool au tiers pendant une heure, on le lave avec soin, et on le soumet à l'action du carmin de Beale ou du picro-carmin.

Pour faire apparaître nettement les contours des cellules blastodermiques, on traite l'œuf par le nitrate d'argent. L'œuf vivant est porté directement dans une solution de nitrate d'argent à 1/3 p. 100. Il y séjourne pendant une demi à deux minutes, suivant l'âge de la vésicule. Il est ensuite immergé dans de l'eau pure et exposé à la lumière. L'excès de la solution d'argent qui a pénétré dans l'intérieur de l'œuf ne peut être enlevé par le lavage, aussi les préparations noircissent rapidement et ne peuvent se conserver.

A partir du quatrième jour, la vésicule blastodermique peut être ouverte au moyen d'aiguilles fines; on lave le blastoderme dans l'eau distillée, on le colore par le picro-carminate, le carmin, l'hématoxyline, l'éosine ou des couleurs d'aniline et on monte soit dans la glycérine soit dans le baume. Ed. van Beneden a obtenu aussi de bonnes préparations au moyen de chlorure d'or.

Pour les taches embryonnaires et les embryons plus avancés, Kœlliker recommande l'emploi de l'acide osmique. Il plonge l'œuf dans une solution à 5 p. 1000, jusqu'à ce qu'il ait pris une teinte légèrement foncée, ce qui exige environ une heure, puis il le met dans l'alcool faible, et douze heures après dans l'alcool à 33° Cartier. Si l'œuf adhère à la muqueuse utérine, il laisse le fragment de muqueuse qui porte l'embryon, étendu, au moyen d'épingles, dans une solution d'acide osmique à 1 p. 1000 pendant quatre à six heures. On peut alors enlever facilement la vésicule blastodermique, et on l'immerge encore pendant quelques heures dans une solution d'acide osmique à 5 p. 1000, avant de la mettre dans l'alcool.

Lorsqu'on veut pratiquer des coupes du blastoderme ou de jeunes embryons, il faut fixer avec soin les objets, puis les durcir. Kœlliker donne la préférence à l'acide osmique. Ed. van Beneden traite les œufs par une solution d'acide chromique à 1 p. 400 pendant vingt-quatre heures. Ils sont ensuite lavés avec soin et placés dans l'alcool faible, puis dans l'alcool de plus en plus fort et enfin dans l'alcool absolu. L'avantage de l'acide chromique est de durcir la vésicule en maintenant une adhésion parfaite des cellules ectodermiques contre la zone pellucide. Le même auteur recommande aussi le liquide de Kleinenberg comme agent fixateur. Nous avons souvent employé ce liquide pour préparer des taches embryonnaires et des embryons de différents âges et nous avons toujours obtenu de très bonnes prépa-

Digitized by Google

rations. Le liquide de Flemming, préparé suivant la formule de Fol, nous a aussi bien réussi ; il en est de même du mélange d'acide osmique et d'alcool préconisé par Ranvier et Vignal. Comme réactif colorant, nous employons le carmin boraté ou l'hémalun ; si l'embryon est un peu volumineux, le carmin aluné acide permet seul d'obtenir une bonne coloration en masse.

Comme masse à inclusion nous employons la paraffine pure de Merck. Les coupes sont faites en série à l'aide du microtome à bascule, à une épaisseur de 1/100 à 1/200 de millimètre et montées dans le baume de Canada.

A consulter aussi Piersol (*Zeit. f. wiss. Zool.*, XLVII, 2, 1888, p. 155); Weysse (*Proc. Amer. Acad. Arts and Sc.*, 1884, p. 285, (vésicule blastodermique de *Sus scrofa*).

OISEAUX

558. Poule, récolte des œufs. — L'œuf de la plupart des Oiseaux commence à se segmenter dans l'oviducte; pour étudier les premières phases du développement, il faudra donc prendre l'œuf dans les voies génitales de la femelle : le grand développement du vitellus permet de manipuler facilement les œufs. Après la ponte, les œufs sont mis en incubation, soit sous la femelle, soit, ce qui est plus commode, dans un appareil spécial à température constante (couveuse, étuve d'Arsonval, etc.). La température doit être maintenue dans le voisinage de 38° C. Si l'on veut conduire le développement assez loin, il faut avoir soin de laisser refroidir chaque jour les œufs pendant quelques instants, de maintenir une certaine humidité dans la couveuse, et de les retourner.

559. Examen superficiel. — Pour étudier l'œuf à l'état frais, on le place au sortir de la couveuse dans une cuvette assez grande pour qu'il puisse être recouvert de liquide. On verse dans le vase une solution contenant 0,75 p. 100 de chlorure de sodium, chauffée à 38°. Puis on brise d'un coup sec la coquille à la grosse extrémité, et on agrandit l'ouverture vers la partie supérieure de l'œuf, à l'aide d'une pince ou de ciseaux. L'aire embryonnaire étant mise à découvert, on peut observer à la loupe l'embryon qui continue à vivre assez longtemps dans le liquide indifférent. Si l'on veut examiner l'embryon vivant par transparence, après avoir enlevé une partie de l'albumine, on sort l'œuf du liquide, et on applique à la surface du vitellus un anneau de papier gommé entourant l'aire embryonnaire ; au bout de quelques

Digitized by Google

minutes, lorsque le papier adhère à la membrane vitelline, on incise circulairement le blastoderme en dehors de l'anneau de papier. On enlève alors cet anneau, après avoir plongé de nouveau l'œuf dans le liquide indifférent ; le blastoderme se détache en même temps que la membrane vitelline et l'anneau de papier, et il peut ainsi être placé dans un verre de montre ou sur une lame de verre et être porté sur le microscope (Duval).

560. Observation sur le vivant (Gerlach, *Nature*, 1886, p. 497 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 359). — Enlever avec des ciseaux la coquille du petit bout de l'œuf ; sortir avec une pipette un peu d'albumine ; le blastoderme vient alors se présenter au-dessous de l'ouverture qu'on a pratiquée, et l'on remet l'albumine. Puis on enduit de gomme arabique les bords de la fenêtre, et sur la gomme on construit un petit mur circulaire avec de la ouate ; sur la ouate on pose un petit verre de montre qu'on y colle avec de la gomme. Lorsque la gomme est assez sèche, on achève de coller le verre de montre par le collodion et le vernis à l'ambre, puis on remet l'œuf dans la position normale dans l'incubateur. Par ce moyen on peut suivre, à travers la fenêtre, le développement de l'embryon jusqu'au cinquième jour, l'œuf étant remis pour chaque observation dans la position verticale.

On trouvera des développements de cette méthode, avec figures d'appareils spéciaux, dans *Anat. Anz.*, II, 1887, p. 583-609 ; voir aussi *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 369.

561. Fixation et durcissement des œufs d'Oiseaux. — Pendant les premières vingt-quatre heures de l'incubation, il est très difficile de séparer le blastoderme du vitellus ; celui-ci doit être durci en entier, au moins superficiellement.

Pour les œufs d'Oiseaux dont le développement est plus avancé, lorsque l'embryon est déjà apparent, on peut facilement séparer le blastoderme du vitellus, ce qui facilite singulièrement les manipulations. L'œuf ayant été ouvert dans une solution de sel marin, on soulève l'œuf, de manière que le blastoderme fasse saillie hors de l'eau ; à l'aide d'une pipette ou d'un tube de verre, on fait tomber à la surface du blastoderme une petite quantité de liquide fixateur (acide osmique à 1 p. 100, mélange d'acide osmique et d'alcool, sérum iodé, liquide de Kleinenberg, acide nitrique à 10 p. 100, etc.). En maintenant le doigt à l'extrémité supérieure du tube ou de la pipette, tandis que l'extrémité inférieure demeure en contact avec le liquide qui recouvre le blastoderme, il reste ainsi au-dessus de l'aire embryon-

Digitized by Google

naire une quantité suffisante de liquide fixateur qu'on renouvelle au fur et à mesure qu'elle s'écoule, en débouchant de temps en temps l'extrémité supérieure du tube ou de la pipette. Au bout de quelques minutes, lorsqu'on juge la fixation suffisante (lorsque l'aire embryonnaire commence à noircir sous l'influence de l'acide osmique, par exemple), on immerge l'œuf dans la solution salée, et à l'aide de petits ciseaux, on pratique une incision circulaire autour de l'aire embryonnaire.

Avec un peu de précaution, on fait alors flotter le blastoderme excisé et on le conduit dans un verre de montre, en ayant soin de le maintenir aussi bien étalé que possible. On peut ainsi le sortir du vase qui contenait l'œuf, et le transporter, soit sous le microscope, pour l'examiner directement, soit dans le réactif durcissant. Au préalable, on enlève, à l'aide de pinces et de quelques secousses dans le liquide, le lambeau de membrane vitelline qui recouvre le blastoderme.

Pour prévenir le recoquillement des bords du blastoderme pendant le durcissement Romiti recommande de placer celui-ci sur la *face convexe* d'un verre de montre (*Boll. Soc. Cult. Sc. Med. Siena*, III, 1885; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, VI, 1886, p. 870).

La fixation par l'acide nitrique à 10 p. 100 présente l'avantage de faciliter beaucoup la séparation du blastoderme. On laisse agir l'acide pendant dix minutes, et l'on porte dans de la solution d'alun à 2 p. 100 (Hofmann, *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 485).

Pour le durcissement, Foster et Balfour (*Éléments d'embryologie*) recommandent le liquide de Kleinenberg pendant cinq heures, puis l'alcool. On peut employer aussi l'acide chromique, une solution à 1/1000 pendant vingt-quatre heures, puis une solution plus forte à 3/1000 pendant encore vingt-quatre heures; l'embryon est mis ensuite dans l'alcool à 70°, pendant un jour, dans l'alcool à 90° pendant deux jours, et enfin dans l'alcool absolu. Si la préparation n'est pas absolument débarrassée d'acide chromique, il faut avoir soin de changer l'alcool jusqu'à ce que l'acide ait complètement disparu.

Foster et Balfour ont employé aussi une solution d'acide osmique à 0,5 p. 100, dans laquelle on laisse l'embryon pendant deux heures et demie, à l'obscurité et dans un vase fermé. On met ensuite la préparation dans l'alcool absolu, en prenant soin d'enlever complètement l'acide par plusieurs lavages à l'alcool.

Nous préférons l'emploi simultané de l'acide osmique et de l'alcool, d'après la méthode de Ranvier et Vignal (n° 39), ou du liquide

Digitized by Google

de Flemming, avec durcissement dans des alcools de plus en plus forts.

La coloration et l'inclusion des embryons d'Oiseaux ne présentent rien de spécial.

562. *Méthode de* Mathias Duval (*Ann. des Sc. nat. Zool.*, 1885). — Dans les premiers stades du développement de l'œuf d'Oiseau, avant l'apparition de la ligne primitive, il est difficile d'orienter la cicatricule durcie, afin de pratiquer des coupes suivant une direction déterminée. M. Duval, se basant sur ce fait que dans l'œuf incubé l'embryon est presque toujours couché sur le jaune, de telle sorte que le gros bout de l'œuf est à sa gauche et le petit bout à sa droite, oriente le blastoderme de la manière suivante. Avec une petite bande de papier, large de 5 millimètres et longue de 50 millimètres, on fait une sorte de cuvette triangulaire sans fond. Celle-ci est appliquée à la surface du jaune, autour de la cicatricule, de façon que sa base réponde à la future région antérieure, et son sommet à la future région postérieure de l'embryon. C'est-à-dire que si le gros bout de l'œuf est à la gauche de l'observateur, le triangle en papier aura son sommet dirigé vers l'observateur.

Avec une pipette on remplit la cuvette en papier d'une solution d'acide osmique à 1 p. 300 ; au bout de quelques minutes, quand le fond de la cuvette commence à noircir, on dépose l'œuf dans une solution faible d'acide chromique : l'albumine est enlevée, et la pièce est mise dans une solution propre d'acide chromique, où elle durcit en quelques jours. Il reste sur la sphère vitelline une surface triangulaire noire, comprenant la cicatricule et indiquant de quel côté se trouve la partie antérieure ; on détache avec un scalpel et de fins ciseaux cette portion triangulaire, dont on achève le durcissement par l'acide chromique et l'alcool.

Duval conseille aussi d'activer le durcissement en plaçant l'œuf, après l'action de l'acide osmique, dans une solution chromique qu'on porte à l'ébullition au bain-marie : après refroidissement, on enlève la région du triangle noir, qui est ensuite durcie plus complètement par l'acide chromique et l'alcool.

La pièce durcie est montée dans le collodion ; on pratique le collodionnage des surfaces de section, et les coupes sont colorées par une solution de picrocarmin étendue d'une forte proportion de glycérine.

A consulter, la critique et modification de cette méthode par Kionka (*Anat. Hefte*, X, p. 391 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 250 (coloration

Digitized by Google

par le carmin boracique, en ajoutant à l'alcool acidulé de lavage quelques gouttes de solution aqueuse d'orange G, qui colore le vitellus en jaune).

563. Préparation de l'embryon tout entier. — Lorsque l'embryon a été fixé par l'acide picrique, l'acide osmique ou le sérum iodé, puis durci par l'alcool, on peut, jusque vers la cinquantième heure environ, en faire des préparations permanentes en surface. L'embryon est coloré par l'une des méthodes indiquées ci-dessus, puis monté dans la glycérine ou dans le baume, après déshydratation. A partir du troisième jour, l'embryon est trop volumineux pour pouvoir être commodément préparé ainsi en totalité.

Cependant, avec beaucoup de patience, on y arrive, même après deux semaines d'incubation, en enlevant soigneusement la coquille morceau par morceau, tout en laissant les membranes entières, voyez Hirota, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1895, p. 118.

REPTILES

564. — Les méthodes exposées pour les embryons des Oiseaux sont applicables à l'étude du développement des Reptiles ; pour les premiers stades du développement, le blastoderme sera durci en place sur le vitellus ; plus tard l'embryon sera isolé facilement et traité par le liquide de Kleinenberg et l'alcool (Strahl, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1881, p. 123).

Voici le fixateur spécial de Perenyi pour les embryons de *Lacerta* (*Zool. Anz.*, 274, 1888, p. 139, et 276, p. 196).

Acide nitrique à 20 p. 100.	3	parties
Acide chromique à 1 p. 100.	3	—
Alcool absolu	4	—

Laisser agir vingt minutes, laver à l'eau.

A consulter aussi, outre la technique de Kupffer (*Archiv f. Anat. u. Entwick.*, 1882, p. 4), celle de C.-F. Sarasin (*Semper's Arbeiten*, 1883, p. 159), et celle de Mitsukuri (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1894, p. 750).

AMPHIBIENS

565. Préliminaires. — Les œufs des Amphibiens, qu'on peut se procurer très aisément, sont cependant difficiles à préparer à cause de l'épaisse couche d'albumine qui les entoure. La transparence de cette enveloppe permet de suivre à la loupe ou au microscope les pre-

Digitized by Google

mières phases de la segmentation et les différents stades du développement de l'embryon ; il suffit pour cela d'éclairer l'œuf à l'aide d'une lentille qui concentre à sa surface les rayons solaires, ou les rayons émis par une lumière artificielle.

Lorsqu'on veut soumettre les œufs à la méthode des coupes, il est indispensable de les dépouiller de leur enveloppe albumineuse. En plaçant des œufs de Grenouille ou de Crapaud dans une solution d'acide chromique à 1 p. 100 pendant deux ou trois jours et en les secouant vivement dans le liquide, on les débarrasse de leur albumine ; mais les œufs ainsi traités sont très cassants et ne donnent que de mauvaises coupes. Ils peuvent cependant être conservés dans la gélatine fondue et très concentrée pour l'étude des formes extérieures.

Un procédé plus efficace a été décrit par Whitman (*Amer. Natural.*, XXII, 1888, p. 857) et Blochmann (*Zool. Anz.*, 1889, p. 269). Whitman met les œufs, après fixation, dans une solution à 10 p. 100 d'hypochlorite de soude allongée de 5 à 6 volumes d'eau, et les y laisse jusqu'à ce qu'on puisse les débarrasser de l'albumen par l'agitation. Pour les œufs de *Necturus* cela arrive en quelques minutes. Blochmann prend de l'eau de Javelle allongée de 3 à 4 volumes d'eau et y secoue les œufs (fixés dans le mélange de Flemming) pendant quinze à trente minutes.

566. Grenouille. *Méthode de* Morgan (*Amer. Nat.*, XXV, 1891, p. 759 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 284). — Pendant certaines périodes du développement des œufs de Grenouille il est très difficile de les débarrasser de la membrane albumineuse intérieure. Morgan procède comme suit. Chaque œuf est découpé de la masse albumineuse générale et mis pour une heure ou jusqu'à douze heures dans une solution saturée d'acide picrique dans de l'alcool à 35 p. 100 additionnée d'acide sulfurique dans la même proportion que dans le liquide de Kleinenberg. Puis on passe par des alcools successivement plus forts depuis 35 p. 100 jusqu'à 70 p. 100. Après que l'œuf a été environ deux jours dans l'alcool à 70 p. 100 la membrane intérieure commence à gonfler ; le troisième ou quatrième jour, on peut la piquer avec une aiguille et en extraire l'œuf (Cf. aussi Whitman, *Methods*, etc., p. 156, et Schultze, *Zeit. f. wiss. Zool.*, V, 1887, p. 177).

567. Grenouille. *Méthode de* O. Hertwig (*Jenaische Zeitschrift f. Naturwiss.*, XVI, 1883, p. 249). — Les œufs sont placés dans l'eau chaude presque bouillante (90 à 96° C.) pendant cinq à dix minutes. L'œuf est coagulé et en même temps durci, tandis que l'enveloppe

Digitized by Google

gélatineuse se sépare un peu de la surface de l'œuf et devient plus friable. On coupe l'enveloppe de l'œuf sous l'eau et on en fait sortir le contenu. A l'aide d'un tube de verre formant pipette on transporte les œufs dans une solution d'acide osmique à 1/2 p. 100 ou dans l'alcool à 70°, 80° et 90°. L'acide chromique rend les œufs cassants ; ceux-ci ne doivent pas rester dans la solution plus de douze heures. Les œufs durcis dans l'acide chromique ne changent pas de forme et ne deviennent pas mous quand on les met dans l'eau ; ceux qui ont été traités par l'alcool perdent leur dureté, gonflent, et changent souvent de forme quand on les met dans l'eau ou dans l'alcool faible. L'acide chromique détruit ou altère le pigment de l'œuf ; l'alcool au contraire le conserve, ce qui est très important pour l'étude des feuillets embryonnaires.

On peut colorer les œufs par des teintures alcooliques ; mais la coloration se fait mal pour les œufs durcis par l'acide chromique.

A consulter aussi pour *Rana*, WHITMAN, *Meth.*, p. 156 (acide osmique à 0,25 p. 100 vingt minutes ; mélange chromo-platinique, vingt-quatre heures ; eau, deux heures ; alcool ; carmin boracique), et pour la tératologie expérimentale de ces œufs, ROUX, *Anat. Anz.*, IX, n° 8, p. 248 et n° 9, p. 265.

568. Axolotl. — Les œufs de l'Axolotl sont plus faciles à préparer que ceux des Batraciens anoures, parce que le vitellus est séparé de la couche albumineuse par un large espace rempli de liquide qui ne se coagule pas sous l'action des réactifs. Les œufs sont placés dans le liquide de KLEINENBERG, ou celui de MAYER, pendant quelques heures ; puis, à l'aide de petits ciseaux ou d'aiguilles, on ouvre le chorion interne et on fait échapper l'œuf à travers l'ouverture par une légère pression. On traite ensuite par l'alcool faible, puis par l'alcool de plus en plus fort.

Une méthode qui nous a donné aussi de bons résultats est celle que HERTWIG emploie pour la préparation des œufs de Grenouille (voir n° 567). Les œufs sont colorés en masse par le carmin boracique ou le carmin aluné acide et inclus dans la paraffine ou la celloïdine. Quand ils sont inclus dans la celloïdine, on pratique le collodionnage des coupes suivant la méthode de DUVAL.

569. Triton. *Méthode de* W.-B. SCOTT et H.-F. OSBORN (*Quart. Journ. of Mic. Sc.*, 1870, p. 449). — La préparation des œufs de Triton présente de grandes difficultés. Avant de durcir l'œuf, il faut au préalable le débarrasser de sa couche d'albumine ; le vitellus étant très

Digitized by Google

fluide et la membrane vitelline étant très délicate, cette opération doit être faite avec les plus grands soins. Il existe dans la couche d'albumine plusieurs membranes concentriques, et il faut inciser chacune d'elles avec des ciseaux fins avant de pouvoir extraire l'œuf ou l'embryon. Ceux-ci sont fixés, soit par l'acide osmique, soit par le bichromate de potasse ou le liquide de MÜLLER ; mais le meilleur réactif est le liquide de KLEINENBERG. On achève le durcissement par l'alcool et on colore par l'hématoxyline de KLEINENBERG.

570. *Méthode de* HERTWIG (*Jen. Zeitschr. f. Naturwiss.*, 1881-82, p. 291). — Les œufs sont mis dans un mélange à parties égales d'acide acétique à 2 p. 100 et d'acide chromique à 0,5 p. 100. Au bout de dix heures on coupe les membranes et on place les embryons dans l'alcool à 70°, 80° et 90°. Pour faire sortir les embryons de l'œuf, il suffit de couper avec de petits ciseaux l'une des extrémités du chorion interne et d'exercer sur ce dernier une légère pression à l'aide d'une aiguille.

571. Sulfate de cuivre. — Nous empruntons à FOL (*Lehrbuch*, p. 106) la formule d'un mélange dû à REMAK et modifié par GŒTTE, qui rendrait des services pour le durcissement des œufs d'Amphibiens.

Sulfate de cuivre, solution aqueuse à 2 p. 100. .	50 cc.
Alcool à 25 p. 100	50 —
Vinaigre de bois rectifié	XXXV gouttes.

572. Autres méthodes — A consulter aussi les procédés de BORN (*Arch. f. mik. Anat.*, 43, 1894, p. 1) ; et de RABL (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 165. (Nous avons déjà donné les procédés de fixation de ce savant.)

POISSONS

573. Poissons osseux. — L'œuf de beaucoup de Poissons osseux peut être étudié à l'état vivant par transparence ; mais celui des Salmonides doit être durci et dépouillé de sa membrane d'enveloppe, si l'on veut étudier les formes extérieures de l'embryon. Enfin tous les œufs doivent être fixés avec soin et durcis lorsqu'ils sont destinés à être mis en coupe.

Pour l'étude de la forme extérieure de l'embryon, les œufs sont mis pendant quelques minutes dans de l'eau acidulée par l'acide acétique (1 à 2 p. 100), puis dans une solution d'acide chromique à 1 p. 100. Au bout de trois jours, on enlève la capsule de l'œuf au

Digitized by Google

moyen de petites pinces fines, en ayant soin d'entamer la capsule du côté opposé au germe ou à l'embryon, pour ne pas les endommager. L'œuf dépouillé de sa membrane est mis dans l'eau distillée pendant vingt-quatre heures, puis dans l'alcool faible et finalement dans l'alcool à 90°. Les embryons ainsi préparés ne sont pas déformés, et leurs éléments histologiques sont à peu près bien conservés. Mais la masse vitelline devient rapidement très dure et très cassante, ce qui est un grave inconvénient pour la pratique des coupes.

Les procédés suivants donnent d'excellents résultats au point de vue de la préparation des embryons destinés à être coupés.

Les œufs sont placés pendant quelques minutes dans une solution d'acide osmique à 1 p. 100 ; lorsqu'ils ont pris une coloration brun clair, on les transporte dans un vase renfermant de la liqueur de Müller. Dans ce liquide chaque œuf est ouvert avec des ciseaux fins; le vitellus, qui se coagule immédiatement au contact de l'eau, se dissout au contraire dans le liquide de Müller ; le germe et la couche corticale peuvent être extraits de la capsule de l'œuf. Le germe ou l'embryon sont laissés dans de la liqueur de Müller propre pendant quelques jours, puis lavés avec soin dans l'eau pendant vingt-quatre heures ; on les met ensuite dans l'alcool faible, puis dans l'alcool fort.

Un autre procédé, qui nous a toujours bien réussi, consiste à fixer les œufs dans le liquide de Kleinenberg additionné de 10 p. 100 d'acide acétique. Au bout de dix minutes, les œufs sont ouverts dans de l'eau renfermant 10 p. 100 d'acide acétique qui dissout le vitellus. Les embryons extraits des œufs sont mis pendant quelques heures dans le liquide de Kleinenberg pur, puis dans l'alcool à 60°, à 70° et à 90°.

Les embryons durcis sont colorés en masse par le carmin aluné acide, le carmin boracique ou l'hématoxyline, et enrobés dans le collodion ou la paraffine.

574. *Méthode de* Kollmann. — Kollmann recommande beaucoup pour fixer les œufs de Téléostéens un mélange contenant :

Bichromate de potasse.	5 p. 100
Acide chromique	2 —
Acide nitrique concentré	2 —

(Nous citons textuellement. Nous supposons qu'il faut entendre un mélange de 5 parties de bichromate, 2 d'acide chromique, 2 d'acide nitrique, et 91 d'eau; et non point un mélange à volumes égaux de solutions de ces substances aux titres indiqués.) Les œufs doivent y rester douze heures. On les lave à l'eau pendant douze heures. On enlève alors le chorion, et on les

Digitized by Google

met dans de l'alcool, à 70 degrés. Kollmann fait observer qu'il est important que ces œufs soient fixés très rapidement. Voyez l'*Arch. f. Anat. u. Physiol.*, de His et Du Bois-Reymond, 1885, p. 296.

575. *Méthode de* Kupffer (*Arch. f. Anat. u. Entwick.*, 1884, p. 20). — Kupffer place les œufs dans une solution d'acide chromique à 1/3 p. 100, pendant vingt-quatre heures, puis pour deux heures dans l'eau distillée. On enlève la capsule de l'œuf. Eau. Alcool. Coloration. Coupes.

576. *Méthode de* Rabl (voir n° 553). — *Méthode de* Perenyi (voir n° 51).

577. *Méthode d'*Agassiz *et* Whitman (*Proceed. of the American Acad. of arts and sciences*, XX, 1884). — Les œufs sont placés dans un verre de montre, dans quelques gouttes d'eau de mer à laquelle on ajoute une quantité égale d'une solution d'acide osmique à 1 p. 100. Après cinq à six minutes, les œufs sont transportés dans le liquide de Merkel, *modifié par* Eisig (n° 53). On les y laisse pendant vingt-quatre heures ou plus. On peut alors séparer le blastoderme du vitellus à l'aide d'aiguilles. Pour les stades plus avancés du développement, les auteurs préfèrent l'emploi du liquide de Perenyi. Voir aussi Whitman, *Methods*, etc., p. 152, et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 912.

578. *Méthode de* Goronowitsch (*Morph. Jahrb.*, X, 1884, p. 381). — Pour obtenir des vues en surface, l'auteur met les œufs dans une solution d'acide nitrique à 5 p. 100 jusqu'à ce que l'embryon devienne visible à travers la membrane (au bout de trois minutes), puis il les place dans une solution d'alun à 5 p. 100. Au bout d'une heure le vitellus est transparent et l'embryon se détache sur lui en blanc. On coupe la membrane de l'œuf dans la solution d'alun et on la sépare de l'embryon. Si l'on veut conserver la préparation, on la monte dans la glycérine à 10 p. 100, à laquelle on ajoute une petite quantité de sublimé.

579. Développement des nerfs craniens des Plagiostomes. *Méthode de* Milnes Marshall (*Quart. Journ. of Mic. Sc.*, 1881, p. 72). — Les embryons sont placés pendant vingt-quatre heures dans une solution d'acide chromique à 1/4 p. 100, à laquelle on ajoute quelques gouttes d'acide osmique à 1 p. 100. Alcool, etc., comme d'habitude.

580. Cyclostomes. *Méthode de* Calberla (*Arch. f. mikr. Anat.*,

Digitized by Google

III, p. 238). — Acide chromique à 1 p. 100 pendant huit à douze heures, puis alcool à 90°. Pour les embryons plus avancés, le liquide de MERKEL.

TUNICIERS

581. Ascidies (MAURICE et SCHULGIN, *Ann. Sc. Nat., Zool.*, XVII, 1884). — Les embryons d'*Amaræcium*, préalablement retirés de la cavité incubatrice de leur mère, sont colorés au carmin boracique, décolorés par l'acide chlorhydrique, puis lavés dans l'alcool à 70°. Ensuite on les met pendant quinze à vingt heures dans une solution extrêmement faible de bleu de Lyon dans l'alcool à 70° additionnée de quelques gouttes d'acide acétique. Après coloration, éclaircir rapidement et inclure dans la paraffine. Ce procédé est surtout recommandable pour la facilité avec laquelle il permet de distinguer les trois feuillets de l'embryon. L'ectoderme prend une coloration beaucoup plus foncée que l'endoderme, ces deux feuillets paraissant surtout bleus, tandis que les cellules mésodermiques, à cause de leurs noyaux volumineux, semblent presque entièrement rouges.

582. Distaplia (DAVIDOFF, *Mitth. Zool. Stat. Neapel*, IX, 1, 1889, p. 118). — Le meilleur fixateur pour les œufs est un mélange de 3 parties de solution saturée de sublimé avec 1 partie d'acide acétique cristallisable. Laisser agir une demi-heure ou une heure, passer par l'eau et les alcools. Un autre mélange presque aussi bon consiste en 3 parties de solution saturée d'acide picrique, et 1 d'acide acétique, qu'on laisse agir pendant trois à quatre heures et porte ensuite dans l'alcool à 70 p 100.

MOLLUSQUES

583. Céphalopodes (Ussow, *Arch. de Biologie*, II, 1881, p. 582). — Les œufs (du *Loligo vulgaris*) sont placés, sans qu'on ait enlevé le chorion, dans une solution d'acide chromique à 2 p. 100, pendant deux minutes, puis l'œuf est mis dans un verre de montre rempli d'eau à laquelle on ajoute une goutte d'acide acétique. Au bout de deux minutes on peut enlever facilement le chorion. Le vitellus de nutrition se répand dans l'eau ; le vitellus de formation, ou le blastoderme, qui a été seul durci par l'action rapide de l'acide chromique, reste seul et peut être coloré par le carmin et monté dans la glycérine.

Digitized by Google

WATASÉ (*Journ. of Morph.*, IV, 1891, p. 249 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 152) fixe dans le liquide macérateur des HERTWIG, (n° 512), et aussitôt que le blastoderme est devenu opaque il l'enlève avec des ciseaux dans de la glycérine diluée. Le liquide de PERENYI donne de bonnes images superficielles de la segmentation.

584. Helix. — Nous avons obtenu de bonnes préparations d'embryons d'*Helix* en opérant de la manière suivante : les œufs sont mis dans le liquide picro-nitrique (n° 77) pendant quatre à six heures. Le carbonate de chaux qui incruste la membrane extérieure est dissous et l'enveloppe albumineuse de l'œuf est coagulée. On ouvre l'œuf avec des aiguilles; l'albumine se détache par fragments et on peut facilement extraire l'embryon. Celui-ci est traité successivement par l'alcool à 50°, 70° et 90°, puis coloré par le carmin boraté alcoolique ou l'hématoxyline et monté dans la paraffine après avoir été déshydraté et traité par l'essence de girofle ou l'huile de cèdre.

585. Limace (*Limax campestris*). *Méthode de* MARK (*Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard Coll.*, VI, 1881). — Les œufs sont traités par l'acide acétique à 1 à 2 p. 100 pendant quatre heures ou plus. On prend l'œuf entre le pouce et l'index de la main gauche, on introduit la pointe d'une paire de ciseaux fins à travers les deux membranes externes, et on pratique une ouverture suffisante pour que la membrane résistante de l'albumine s'échappe avec son contenu. On place l'œuf sur une lame de verre avec une goutte d'eau et on enlève les enveloppes extérieures. Des portions de l'enveloppe semi-fluide restent attachées à la surface de la membrane résistante. Sous une loupe à disséquer on enfonce une aiguille à travers la membrane résistante et on maintient l'œuf, tandis qu'avec une autre aiguille on déchire la membrane pour faire sortir l'œuf avec l'albumen. On sépare l'œuf de l'albumen; on colore et on monte à la glycérine.

Pour les stades plus avancés du développement et pour pratiquer des coupes, on traite par l'acide osmique au lieu d'employer l'acide acétique, et on durcit les enveloppes albumineuses en même temps que l'œuf.

Voici les procédés recommandés par HENCHMAN (*Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard Coll.*, XX, 1890, p. 171 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 274) pour le traitement des embryons de *L. maximus*. On récolte une trentaine d'individus adultes et on les met dans un seau de fer-blanc muni d'un couvercle percé de trous. On les nourrit de choux en ayant soin de les tenir très proprement. On trouve les œufs en géné-

Digitized by Google

ral le matin, disposés par paquets. Dans un local chaud l'éclosion a lieu entre le vingt-deuxième et le vingt-septième jour. Il faut bien veiller à ce que les œufs ne se dessèchent pas. Fixation par l'acide chromique à 0,33 p. 100 ou par le liquide de Perenyi. Il vaut mieux n'enlever que l'enveloppe externe avant de mettre les œufs dans le liquide; après un séjour de deux ou trois minutes dans le liquide, l'enveloppe interne peut être enlevée. Cependant si l'on emploie le liquide de Perenyi il est nécessaire d'éloigner les deux membranes en premier lieu, sinon l'albumine sera coagulée d'une façon qui empêche de sortir les embryons.

Voir aussi Schmidt, *Studien zur Entwickelungsgesch. d. Pulmonaten*, Dorpat, 1891; et Washburn, *Amer. Natural.*, XXVIII, 1894, p. 528, ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1894, p. 531.

586. Chiton. Voir Metcalf, *Stud. Biol. Lab. John Hopkins Univ.*, V, 1893, p. 251; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1894, p. 129.

ARTHROPODES

587. Fixation. — La grande majorité des auteurs très nombreux que nous avons consultés sont d'accord que les œufs des Arthropodes se fixent en général mieux par la chaleur que de toute autre façon. Si l'on désire éviter l'emploi de la chaleur, nous conseillons d'essayer l'acide picro-sulfurique (concentré) ou le liquide de Perenyi.

588. Enlèvement des membranes. — Cette opération est souvent fort délicate et il se peut que ce soit indiqué de ne pas la tenter, mais de laisser les membranes en place et se contenter de les ramollir par l'eau de Javelle ou l'eau de Labarraque (Looss, List). Morgan (*Amer. Natural.*, 1888, p. 357; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, I, 1889, p. 69) recommande pour les œufs de *Periplaneta* l'eau de Labarraque allongée de 5 à 8 volumes d'eau et légèrement chauffée. Ce liquide ramollira suffisamment les membranes en trente à soixante minutes si on l'emploie avant fixation; les œufs fixés demanderont plus de temps. Il va sans dire qu'on doit veiller à ce que le liquide ne pénètre pas dans l'œuf.

589. *Méthodes de* Henking. — Pour tout ce qui regarde cette branche de la technique, consulter le travail minutieux de ce spécialiste dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 2, 1891, p. 156. Le cadre de cet ouvrage ne nous permet de citer qu'un procédé qui est dit éviter la difficulté

Digitized by Google

causée par la friabilité du vitellus, qui s'oppose beaucoup à la confection des coupes. Après fixation et passage par les alcools, piquer le chorion avec une aiguille, et colorer au carmin boracique. Mettre pendant douze heures dans un liquide composé de 20 cc. d'alcool à 70 p. 100, une goutte d'acide chlorhydrique concentré, et la pointe d'un couteau de pepsine. On traite ensuite par l'alcool, l'essence de bergamote et la paraffine, et, à quelques exceptions près, parmi lesquelles les œufs de *Bombyx mori*, les œufs se couperont sans se briser.

590. Lépidoptères. Bobretzky (*Zeit. f. wiss. Zool.*, XXXI, 1878, p. 198). — Les œufs (de *Pieris cratægi* et de *Porthesia chrysorrhæa*) sont légèrement chauffés dans l'eau et placés pendant seize à vingt heures dans une solution d'acide chromique à 0,5 p. 100. Les membranes peuvent alors être enlevées et les œufs, mis pendant quelques heures dans l'alcool absolu, sont colorés par le carmin et coupés.

591. Phryganides (*Neophalax*) et **Blatte**, *Méthode de* Patten (*Quart. Journ. of Micr. Sc.*, oct. 1884, p. 549). — Les œufs ou les larves sont placés dans de l'eau froide qu'on porte graduellement à 80° C. On cesse de chauffer quand les œufs sont durs et blancs. Après refroidissement, on les met dans l'alcool à 20°, auquel, au bout d'un ou deux jours, on ajoute 10 p. 100 d'alcool jusqu'à ce qu'on arrive à un alcool à 90°; on évite ainsi le ratatinement des tissus. Les teintures alcooliques peuvent seules traverser le chorion; celles qui donnent les meilleurs résultats sont l'hématoxyline de Kleinenberg et la teinture de cochenille de Mayer à 70 p. 100. Les œufs doivent rester dans l'hématoxyline pendant cinq à six jours; on les décolore graduellement par l'alcool acidulé par l'acide chlorhydrique (une goutte d'acide chlorhydrique dans 20 grammes d'alcool), dans lequel les œufs doivent rester pendant plusieurs jours. On les transporte alors dans l'alcool pur, que l'on renouvelle une ou deux fois jusqu'à ce que les œufs aient repris leur couleur violette. On traite ensuite par l'alcool absolu, le benzol, une solution saturée de paraffine dans le benzol, et finalement on enrobe dans la paraffine pure.

592. Aphidiens. *Méthode de* L. Will (*Semper's Arbeiten*, 1883, p. 223). — On pratique des coupes à travers le Puceron entier renfermant des œufs et des embryons. Pour cela, l'animal est mis dans de l'eau chaude à 70° C., puis dans l'alcool faible et de plus en plus fort. Pour colorer en masse, il faut piquer avec une aiguille fine la cuticule du Puceron; le carmin au borax et l'hématoxyline sont les colorants qui réussissent le mieux.

Digitized by Google

593. Phalangides. *Méthode de* BALBIANI. — Les œufs du *Phalangium opilio* sont entourés d'un chorion couvert de corpuscules jaunes qui les rend tout à fait opaques. Pour les éclaircir on les place dans une petite capsule de porcelaine renfermant de l'eau à laquelle on ajoute quelques gouttes d'une dissolution de potasse; on chauffe jusqu'à ébullition. On met les œufs sur du papier à filtrer et, en les frottant légèrement avec un pinceau, on enlève facilement le chorion. La membrane vitelline reste intacte et sa transparence permet de voir l'embryon.

594. Autres travaux à consulter. — Blattida, WHEELER, *Journ. of Morph.*, III, 1889, p. 292; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 250; CHOLODKOWSKY, *Mem. Acad. Imp. St-Petersburg*, XXXVIII, 1891; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 80; HEYMONS, *Zeit. f. wiss. Zool.*, LIII, 1892, p. 434; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 343. Diptera, HENKING, *op. cit.*; RITTER, *Zeit. f. wiss. Zool.*, L, 1890, p. 408; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 1, 1891, p. 87. Araneina, KISHINOUYE, *ibid.*, IX, 2, 1892, p. 215; et dans les travaux plus anciens les suivants: — **Histolyse des tissus larvaires des Diptères**, H. VIALLANES (*Ann. des Sc. nat. Zool.* 1883, p. 129 du tirage à part). — **Araignées**, BALFOUR (*Quart. Journ. of micr. Sc.*, 1880, p. 167). — **Œufs d'Agelena**, LOCY (*Bull. Mus. Comp. Zool., Cambridge, Harvard Coll.*, XII, n° 3, 1886; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 242). — **Écrevisse**, REICHENBACH (*Zeitsch. f. wiss. Zool.*, XXIX, 1877, p. 124). — **Moina rectirostris**, GROBBEN (*Arb. a. d. Zool. Inst. der Univ. Wien*, 1878, p. 208). — **Amphipodes** (*Orchestia*); ULIANIN (*Zeit. f. wiss. Zool.*, XXXV, 1881, p. 441).

VERS

595. Clepsine. O. WHITMAN (*Quart. Journ. of Mic. Sc.*, 1878, p. 216).

Vues en surface des bandes germinatives. Les œufs traités par l'acide chromique pendant cinq à dix heures montrent bien la disposition linéaire des cellules nerveuses. Pour voir la face interne, il est nécessaire de séparer les bandes germinatives du vitellus. Pour cela, l'embryon est placé à l'état frais sur le porte-objet avec une goutte d'eau à laquelle on ajoute un peu d'acide acétique, avec l'extrémité d'une aiguille; à l'aide de deux aiguilles on brise l'œuf du côté dorsal, et on peut ainsi séparer le vitellus. On enlève une partie de l'eau avec du papier buvard; on ajoute quelques gouttes d'acide osmique sans déranger l'objet. Au bout d'une heure, on lave et on colore.

596. Lombric (*Lumbricus trapezoides*). KLEINENBERG (*Quart. Journ. of Mic. Sc.*, 1879, p. 207). — Les premiers stades du déve-

Digitized by Google

loppement peuvent être suivis sur l'œuf vivant, mais lorsque les contours des cellules cessent d'être visibles, on doit avoir recours aux réactifs. L'acide osmique employé à l'état de vapeur donne de bons résultats, mais le liquide picro-sulfurique (liqueur de Kleinenberg) vaut encore mieux. Lavage à l'alcool à 70° et 90°, puis coloration par l'hématoxyline. Déshydratation et coupes par la paraffine.

Wilson (*Journ. of Morph.*, III, 1889, p. 445; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 402) trouve que le liquide de Perenyi est le meilleur fixateur, étant en général supérieur même au mélange de Flemming.

A consulter aussi pour les Chétopodes, von Wistinghausen, *Mitth. a. d. Zool. Stat. Neapel*, X, 1891, p. 41; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 479 (*Nereis*).

597. Planaires d'eau douce (Iijima, *Zeitschrift f. wiss. Zool.*, XL, 1884, p. 359). — La capsule renfermant les œufs est ouverte, à l'aide de fines aiguilles, dans de l'acide nitrique dilué à 2 p. 100 sur le porte-objet. On imprime quelques secousses à la lame de verre pour détacher autant que possible les œufs des cellules vitellines. Les œufs se montrent à l'œil nu comme de petites masses blanches. Une lamelle supportée par de petits pieds de cire ou de petits morceaux de papier est placée sur les œufs. Après environ trente minutes, on remplace l'acide acétique par de l'alcool à 70°. Au bout d'une heure on remplace l'alcool par de l'alcool à 90°, dans lequel les œufs restent deux heures. On substitue ensuite à l'alcool un mélange par parties égales d'eau et de glycérine, et finalement de la glycérine pure. Pour obtenir des coupes des embryons, qui sont trop petits pour être traités séparément, on durcit en masse le contenu de la capsule par l'acide chromique à 1 p. 100.

598. Ténias (Ed. van Beneden, *Arch. de Biologie*, II, 1881, p. 187). — Les œufs sont soumis sur le porte-objet à l'action d'une solution d'acide osmique à 1 p. 100, puis traités pendant une heure environ par l'alcool au tiers, lavés ensuite à l'eau distillée et soumis pendant deux ou trois jours à l'action du picro-carmin. On monte les œufs dans la glycérine picro-carminatée. Lorsqu'il s'est formé autour de l'embryon une membrane chitineuse, celle-ci ne permet plus aux réactifs de pénétrer. Avec un peu d'habitude, on parvient à enlever au moyen de papier à filtrer une quantité suffisante de liquide pour que le couvre-objet, exerçant sur les embryons une pression modérée, détermine la rupture de l'enveloppe chitineuse ; l'embryon peut alors subir l'action des réactifs.

Digitized by Google

ÉCHINODERMES

599. Cucumaria doliolum. SELENKA (*Zeitschr. f. wiss. Zool.*, XXXV, p. 167). — Les embryons et les larves sont mis dans un verre de montre avec le moins d'eau possible, et traités par l'acide osmique ou mieux par une solution d'acide chromique à 1 ou 3 p. 100 additionnée de quelques gouttes d'acide osmique à 1 p. 100. Au bout de trois à cinq minutes, on lave à l'eau, puis on traite par l'alcool, l'alcool absolu, l'essence de térébenthine et on monte dans le baume. Quand on veut pratiquer des coupes, on colore au préalable par le carmin et on enrobe dans la paraffine.

CŒLENTÉRÉS

600. Éponges. F.-E. SCHULTZE (*Zeit. f. wiss. Zool.*, XXXI, p. 295). — Pour étudier le développement du *Sycandra raphanus*, Schultze place les œufs et les larves dans une petite chambre humide sur le porte-objet et entretient l'aération de l'eau au moyen de petits fragments d'algues vertes qui dégagent de l'oxygène. Il fixe les œufs par l'acide osmique et colore au picro-carmin.

601. SCHULTZE (*ibid.*, 1880, p. 416) prépare ainsi les larves plus avancées et sessiles de *Plakina :* on choisit des larves qui se sont attachées à des feuilles d'algues minces ; on les traite en place, avec l'algue, par acide osmique, alcool à 52°, carmin aluné, eau distillée, alcool à 52°, alcool à 70°, 95°, absolu, essence de térébenthine, paraffine. On pratique des coupes à travers l'embryon et l'algue.

Digitized by Google

CHAPITRE XXV

MÉTHODES CYTOLOGIQUES

602. Étude de la cellule vivante. — Généralement l'examen de la cellule vivante, isolée ou en place dans les tissus d'un animal, ne donne que des renseignements très imparfaits sur la structure de cet élément. Les organismes inférieurs, les Protozoaires, les globules sanguins, les œufs, etc., peuvent cependant être étudiés à l'état vivant. C'est ainsi que Balbiani a pu observer dans l'ovule des Arachnides la formation de vacuoles dans la tache germinative et les mouvements de cette tache.

On peut aussi examiner les cellules vivantes dans la queue transparente des jeunes larves d'Amphibiens, Axolotl, Triton, Grenouille, Crapaud. On insensibilise les larves, soit par le curare, soit par l'éther, soit par la nicotine.

Curare. — On dissout une partie de curare dans 100 parties d'eau et on ajoute 100 parties de glycérine. On place la larve dans un verre de montre rempli d'eau, dans laquelle on verse 5 à 10 gouttes de la solution, suivant la grosseur de la larve. Il faut une demi-heure à une heure d'immersion pour obtenir la curarisation de la larve. Il n'est pas nécessaire de laisser les larves dans la solution jusqu'à ce qu'elles soient immobiles : dès que leurs mouvements sont ralentis, on les enlève et on les met sur un porte-objet avec du papier brouillard. Si on les remet dans l'eau, elles reviennent à l'état normal au bout de huit à dix heures, et peuvent être curarisées de nouveau plusieurs fois. (Peremeschko, *Arch. f. mik. Anat.*, XVI, 1879, p. 437.)

Éther. — Une solution d'éther à 3 p. 100, ou d'alcool au même titre, peut être employée. Ces agents n'arrêtent pas le processus de la division cellulaire, mais leur action anesthésique est inconstante.

Digitized by Google

Tabac. — Les larves d'Amphibiens placées dans une infusion de tabac sont immobilisées en quelques minutes : mises dans l'eau, elles reviennent à l'état normal au bout de quatre à cinq heures.

PEREMESCHKO coupe la queue à une larve vivante, et place l'organe dans un milieu indifférent, tel que le sérum iodé, une solution de sel marin à 1 p. 100, le sirop, l'eau froide (+ 1° C.) ou l'eau chaude (35° à 40° C.).

FLEMMING, dans le même but, a choisi la Salamandre. Chez l'adulte, on peut observer la vessie qui est assez transparente ; chez la larve, les branchies et la nageoire caudale. Les branchies sont difficiles à fixer dans une position convenable pour l'observation ; de plus, elles sont fortement pigmentées. Dans la queue, il y a toujours, au voisinage des membres postérieurs, un endroit dépourvu de pigment ; et, sur les larves faiblement pigmentées, on peut trouver de semblables endroits, sur la moitié ventrale de la queue et le long de la ligne latérale. Sur une larve à queue aplatie, il est possible d'étudier les endroits dépourvus de pigment avec un numéro 12 à immersion de Hartnack. La larve est fixée dans une cellule appropriée, ou enveloppée dans du papier brouillard mouillé ; on peut aussi la curariser, ou en séparer la queue. Des objets favorables pour faire des préparations sont fournis par les lamelles délicates qui sont attachées aux branchies cartilagineuses du côté de la bouche.

D'autres objets favorables (FLEMMING, *Arch. f. mik. Anat.*, XXXV, 1890, p. 275, et XXXVII, 1891, p. 249 et 685) sont les poumons, le péritoine pariétal et le mésentère de ces mêmes larves. Pour préparer le poumon, on prend une larve de pas plus de 4 centimètres de longueur, et on la tue en la plongeant dans le mélange chromo-acéto-osmique. On ouvre par une incision la cavité du corps, et l'on sort les viscères avec précaution en ayant soin surtout qu'il ne se forme pas de plis dans les poumons, et on les laisse exposés à l'action du liquide. Après une fixation suffisante, on tire les poumons sur une lamelle, et l'on enlève à chacun d'un trait de scalpel une étroite lanière le long de ses bords. Cela fait, on sépare l'une de l'autre les deux parois pulmonaires ainsi dégagées, qui donnent chacune une préparation plate et mince.

On peut aussi utiliser l'intestin de l'adulte, en en faisant des coupes à la paraffine (M. HEIDENHAIN, *Kern und Protoplasma*, p. 111). Cet organe offre à l'étude les volumineuses cellules épithéliales des cryptes intestinaux, et de nombreux leucocytes, objet, au dire de Heidenhain, particulièrement favorable.

LÖNNBERG (Cf. *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 377) recommande

Digitized by Google

l'épithélium intestinal d'Escargots hibernants comme fournissant des figures karyokinétiques en grande abondance. Les Escargots (*H. pomatia*) doivent être gardés pendant quelques jours dans une pièce chauffée. On les débarrasse ensuite de leur épiphragme calcaire et on les nourrit pendant trois jours de feuilles de chou avant de les sacrifier.

Les larves des Salamandres sont produites par des individus adultes, conservés en captivité, et ayant à leur portée un vase renfermant de l'eau dans laquelle ils déposent spontanément leur progéniture. Au mois de mai, on peut tuer les femelles et extraire les larves. Celles-ci peuvent être conservées en changeant fréquemment l'eau, et en leur donnant chaque jour, ou tous les deux jours, à manger des Vers aquatiques, tels que le *Tubifex rivulorum*. Il est très important que l'alimentation soit abondante et régulière, sans quoi les cytodiérèses deviennent rares, et peuvent même faire défaut entièrement.

Schleicher (*Arch. f. mik. Anat.*, XVI, p. 248) a pu suivre les différentes phases de la karyokinèse dans les cellules vivantes du cartilage des têtards de Grenouille et de Crapaud. Le cartilage se desséchant très vite au contact de l'air, il faut, pour en étudier des coupes fraîches, les placer de suite sous une lamelle lutée ensuite avec de la paraffine. On peut aussi se servir de la chambre humide ; si on veut employer des réactifs, on les fait arriver par imbibition sous la lamelle.

603. Coloration des cellules vivantes. — Voyez au numéro 97.

604. Étude des cellules fraîches, soit légèrement fixées. — Flemming a fait remarquer avec raison que certains liquides dits *indifférents* ne sont pas cependant sans action sur les cellules et les noyaux ; tels sont le sérum iodé, l'eau salée, le sérum sanguin, l'humeur aqueuse, la lymphe, etc., qu'il faut considérer comme des agents fixateurs faibles. Entre ces fixateurs très faibles, et les réactifs énergiques tels que le mélange de Flemming ou les solutions concentrées de sublimé, viennent se placer des fixateurs doux comme l'acide picrique ou l'acide acétique dilué. Ce sont ces agents doux dont il convient de faire usage pour l'étude des cellules fraîches et isolées.

Voici un exemple de ce genre de travail. On dissocie avec des aiguilles un lambeau de tissu vivant dans une goutte de solution forte de vert de méthyle additionnée d'environ 0,75 p. 100 d'acide acétique. Les cellules sont tuées instantanément dans ce liquide, sans subir de changement de forme. On achève la fixation en exposant la préparation pendant un quart d'heure aux vapeurs d'acide osmique, on

Digitized by Google

ajoute une goutte de solution de Ripart et Petit, et l'on couvre d'une lamelle mince. Un autre procédé consiste à fixer d'abord par les vapeurs d'acide osmique, pendant trente secondes à deux minutes, puis à ajouter une goutte de vert de méthyle, et après cinq minutes laver à l'acide acétique à 1 p. 100 et monter dans une goutte de solution de Ripart et Petit.

Ou bien on peut fixer les cellules en dissociant le tissu vivant dans de la solution de Ripart et Petit, qu'on peut additionner au besoin d'une trace d'acide osmique, et colorer ensuite par le vert de méthyle.

L'élaboration de ces méthodes importantes est due en grande partie à CARNOY.

Pour l'étude de beaucoup de cellules, surtout des éléments du testicule, on peut employer avec succès la méthode de PICTET (*Mitth. aus d. Zool. Station zu Neapel.*, Bd X, Ht. 1, 1894, p. 92). Les éléments sont dissociés dans une solution de chlorure de manganèse de 1 à 10 p. 100 additionnée de violet dahlia. La concentration du liquide doit varier avec la nature des éléments, et l'on doit déterminer le degré de concentration au moyen de quelques tâtonnements, soit en ajoutant de l'eau à la solution, soit en la renforçant avec une solution plus forte de chlorure de manganèse.

A consulter aussi la méthode de FLEMMING (*Arch. f. mik. Anat.*, XX, 1881, p. 3) pour l'étude de la division des œufs d'Échinodermes. Flemming se servait pour fixer et colorer en même temps du carmin acétique de SCHNEIDER, ou bien il colorait d'abord par une goutte de safranine, et fixait les cellules ensuite par l'acide acétique, qui servait en même temps à différencier la couleur. On trouvera certainement que pour la majorité des objets les méthodes de CARNOY valent mieux.

Il va sans dire qu'on peut varier les méthodes que nous avons décrites par l'emploi d'autres fixateurs et d'autres colorants. Le brun Bismarck est un colorant fort commode pour ce genre d'observations. On peut le dissoudre dans de la glycérine diluée.

605. Quelques réactions microchimiques. — Le *vert de méthyle* est un réactif pour la nucléine (soit chromatine) *à l'état frais* tout comme l'iode est un réactif pour l'amidon. Il ne colore, *au sein du noyau*, que la *chromatine seule ;* il ne colore ni les nucléoles, ni le caryoplasma (ou suc nucléaire des auteurs), ni la membrane. C'est pour cela que nous lui attribuons le caractère de réactif spécifique de la nucléine, caractère qu'il ne convient pas d'attribuer aux carmins, à l'hématoxyline, à la safranine, etc., ces réactifs colorant selon les cas d'une manière plus ou moins intense les nucléoles, le

Digitized by Google

[illegible] — [illegible] Mais [illegible] — [illegible] *recourir à d'autres moyens pour établir avec certitude la présence ou l'absence de la nucléine.* C'est à Carnoy (voyez ses publications depuis 1883, *passim*) que revient l'honneur d'avoir établi ce principe, et d'avoir mis en œuvre d'une manière systématique les méthodes *microchimiques* dans l'étude des noyaux. Nous lui empruntons les indications suivantes. La nucléine se distingue Carnoy, *Manuel de Microscopie*, etc., 1879, des lécithines et des albuminoïdes en ce que, à l'encontre de celles-ci, elle est insoluble (ou à peu près) dans l'eau et les acides minéraux étendus tels que l'acide chlorhydrique au millième. Elle est facilement soluble dans les acides minéraux concentrés, dans les alcalis même très dilués, et dans quelques sels alcalins, tels que le carbonate de potasse et le biphosphate de soude. En présence d'une solution de chlorure de sodium au dixième, elle se gonfle et forme une masse gélatineuse, ou même, ce qui arrive souvent, se dissout entièrement (Carnoy, *La Biologie cellulaire*, p. 208-209). Elle ne se digère (lorsqu'elle est *in situ* dans le noyau) qu'en partie dans le liquide digestif. Dans la pratique, on peut employer comme dissolvants la potasse à 1 p. 100, l'acide chlorhydrique fumant, ou, ce qui vaut souvent mieux, le cyanure de potassium ou le carbonate de potasse. Carnoy (*loc. cit.*, p. 244) préfère en général

Digitized by Google

ces deux réactifs aux alcalis dilués. Il les emploie en solution de 40 à 50 p. 100. Si l'on désire enlever toute la nucléine, il est nécessaire de prolonger l'action des dissolvants, surtout lorsqu'on opère sous le verre à couvrir, ce qui est toujours à conseiller pour éviter la déformation des noyaux. Il faut souvent jusqu'à deux ou trois jours pour enlever jusqu'aux dernières traces de nucléine. Il faut se rappeler (*loc. cit.*, p. 210) que ces expériences doivent être faites sur des cellules *fraîches*, car à la suite du durcissement opéré par les agents fixateurs la nucléine paraît subir des modifications assez profondes; elle devient pour ainsi dire insoluble dans l'ammoniaque, la potasse, le phosphate de soude, etc. ; seul, l'acide chlorhydrique la gonfle et la dissout encore, quoique difficilement.

La nucléine présente vis-à-vis de l'iode, de l'acide nitrique (au moins à chaud) et du réactif de MILLON, les réactions des matières protéiques.

Nous venons de parler des dissolvants de la nucléine comme fournissant une preuve de la vraie nature chimique des substances que l'on peut soupçonner être de la nucléine. Ces dissolvants ont une autre qualité précieuse. En enlevant totalement toute la nucléine d'un noyau, on arrive à pouvoir étudier à l'aise la structure réticulée du *caryoplasma*, élément qui dans la plupart des noyaux se trouve caché par l'abondance de l'élément nucléinien. Dans ce but, il convient de faire agir les réactifs avec une grande lenteur.

La *digestion partielle* peut rendre des services pour l'étude de l'élément nucléinien. Nous avons dit que la nucléine *in situ* dans les noyaux se laisse digérer en partie, à l'état frais. Mais elle résiste beaucoup plus longtemps que les albumines à l'action du liquide digestif; une digestion modérée sert donc à mettre à nu l'élément nucléinien en le débarrassant des granulations caryoplasmiques qui en obscurcissent les contours, et sert de la même manière à éclaircir le corps cellulaire.

Dans les lignes qu'on vient de lire le terme « nucléine » a été employé comme synonyme de ce qu'on nomme aujourd'hui plus volontiers « chromatine ». Il me semble que le terme « chromatine » est plus précis et préférable. En effet, on admet maintenant (HALLIBURTON, *Goulstonian Lectures on the Chemical Physiology of the Animal Cell.*, 1893, p. 574, surtout du compte rendu du *British Medical Journ.*, n° 1681, 18th March, 1893) qu'il existe non une seule nucléine, mais *toute une série de « nucléines »* différant entre elles surtout sous le rapport de leur richesse respective en phosphore et en substances protéiques. Elles forment une chaîne, dont le chaînon le plus élevé est représenté par l'acide nucléique, contenant de 9 à 11 p. 100 de phosphore et point de substance protéique (ce composé se trouve, dans

Digitized by Google

la nature, dans les têtes des zoospermes). Ensuite viennent les corps habituellement dénommés « nucléines », consistant en des substances protéiques avec des proportions variables d'acide nucléique. A l'extrémité inférieure de la chaine se trouvent les nucléines qui consistent presque entièrement de substances protéiques, avec seulement 0,5 à 1 p. 100 de phosphore. Ce sont les corps qu'on a appelés les « nucléo-albumines » ; on pourrait également les appeler les « plastines artificielles ».

Tous ces corps ont été isolés des tissus les plus variés de l'organisme animal, et ont aussi été préparés artificiellement. Une série parallèle de nucléines existe dans le noyau lui-même. Il y a les nucléines les plus riches en acide nucléique; celles-ci sont très solubles dans les alcalis, et difficiles à précipiter par les acides ; la chromatine en est une. Il y a les nucléines moins facilement solubles dans les alcalis et moins riches en acide nucléique; ce sont les plastines ; la pyrénine des nucléoles plasmatiques en est une. Et il y a des nucléines encore plus pauvres en acide nucléique ; ce sont les nucléo-albumines (qui existent également dans le cytoplasme ; — la paralinine, ou suc nucléaire paraît consister en partie de ces corps, en partie de composés entièrement privés de phosphore). Il paraît douteux si la chromatine est ou n'est pas de l'acide nucléique pur. Voici, d'après HALLIBURTON, les réactions par lesquelles elle ressemble à l'acide nucléique : « 1° elle ne donne pas la réaction de Millon, ni les réactions xantho-protéiques; 2° elle est facilement soluble dans les alcalis, difficilement dans les acides; 3° elle est soluble dans le ferrocyanure de potassium dissous dans l'acide acétique; 4° après traitement pendant vingt-quatre heures par une solution concentrée de sulfate de cuivre elle perd son affinité pour les matières colorantes ; mais elle ne s'y dissout pas comme l'avait prétendu Schwarz; 5° elle a une grande affinité pour les couleurs de la houille, surtout pour les couleurs basiques comme le vert de méthyle. En présence d'un mélange de vert de méthyle et de fuchsine acide, l'acide nucléique se colore en vert. Dans ce même mélange, les nucléines un peu moins riches en phosphore se colorent en un violet bleu, tandis que celles qui sont les plus pauvres en phosphore se colorent en rouge. Or, dans les noyaux qui se trouvent en cinèse, moment où il s'y trouve un maximum de chromatine, la chromatine se colore dans ce mélange en vert; tandis que dans les noyaux au repos, alors qu'il s'y trouve une plus grande proportion de pyrénine, la coloration est bleue. »

Il résulterait de ces considérations que les nucléines, et par conséquent la chromatine des noyaux, seraient des corps *basophiles ;* et que les albumines, et par conséquent le cytoplasme en général, seraient *acidophiles*. Voyez ce que nous avons dit à ce sujet au numéro 160. En tout cas, les considérations ci-dessus paraissent justifier l'emploi du mot « chromatine » pour l'élément du noyau qui se colore dans le vert de méthyle; le mot « nucléine » ayant obtenu une signification plus étendue.

A consulter aussi sur ce sujet KOSSEL, dans *Das Mikroskop* de BEHRENS, KOSSEL und SCHIEFFERDECKER, II, p. 47, et dans *Verh. d. physiol. Ges. Berlin*, 21 oct. 1892 ; MALFATTI, *Ber. d. naturw. med. Vereins in Innsbruck*, 1891-2 ; ZACHARIAS, *Ber. d. deutschen botan. Ges.*, X, 1893, p. 188 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 1, 1893, p. 80 ; LILIENFELD, *Verh. d. phys. Ges. Berlin*, 1892-3, numéro 11 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 1, 1893, p. 80 ; ZACHARIAS, *Ber. d. deutsch. bot. Ges.*, XI, 1893, p. 293 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 373.

Digitized by Google

Pour les réactions microchimiques du *phosphore* dans les éléments des tissus voyez LILIENFELD und MONTI, dans *Zeit. f. phys. Chemie*, XVII, 1892, p. 410 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 332) ; aussi dans le travail précité de HALLIBURTON, p. 505.

606. Fixations cytologiques. — FLEMMING, qui a fait une étude approfondie de l'action des divers agents fixateurs sur les différents éléments cellulaires, a publié le résultat de ses recherches dans différents mémoires parus dans l'*Arch. f. mik. Anat.* (1879, 1880, 1881), et dans son ouvrage *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*, 1882. Nous lui empruntons en grande partie les faits que nous allons exposer.

Les acides acétique, formique, chlorhydrique et nitrique en solution très faible (1 p. 100 ou moins) sont de bons agents fixateurs des cellules. En suivant leur action sous le microscope, on voit apparaître dans le protoplasma cellulaire et dans le noyau des détails très délicats, mais qui ne tardent pas à disparaître si l'action du réactif se prolonge. Si l'on n'arrête à temps l'action du réactif, il devient très difficile d'obtenir de bonnes préparations permanentes, parce que la fixation n'a pas été suffisante et que la cellule se laisse gonfler ou ratatiner par les réactifs auxquels on la soumet ultérieurement. Lorsqu'on se contente de faire des préparations *extemporanées*, et lorsqu'on se propose de déceler la présence de noyaux, soit dans un organisme inférieur soit dans des éléments cellulaires, une solution faible d'acide acétique colorée par le vert de méthyle rendra, comme nous l'avons dit plus d'une fois, les plus grands services ; son action est presque instantanée, les noyaux sont colorés en même temps que fixés.

L'acide osmique en solution de 0,1 à 2 p. 100 fixe bien la forme de la cellule entière, mais il gonfle les noyaux et ratatine les nucléoles; quelquefois il rend de plus le « réticulum » nucléaire invisible, et empêche une bonne coloration ultérieure des éléments. Ce réactif est cependant précieux lorsqu'on veut fixer des éléments doués de mouvement, comme les cellules amiboïdes, parce qu'il les tue instantanément avec la forme qu'ils possèdent au moment où on le fait agir.

Les solutions d'acide chromique de 0,1 à 0,5 p. 100 fixent bien les noyaux ; des solutions plus fortes les ratatinent, mais il est à remarquer qu'avec la même solution et les mêmes objets on n'obtient pas toujours un résultat identique, ce qui ne peut s'expliquer, d'après FLEMMING, que par un état physiologique différent des tissus. L'acide chromique, comme l'acide osmique, ne permet pas d'obtenir une bonne coloration, et nous avons remarqué qu'il altérait souvent les

Digitized by Google

figures karyokinétiques. Cependant l'acide chromique donne de bons résultats pour les cellules des Vertébrés, lorsque son action n'est pas prolongée.

Les sels de chrome, bichromate de potasse ou d'ammoniaque, font nettement apparaître un réseau dans le protoplasma cellulaire et dans le noyau ; mais ces sels altérant considérablement les figures karyokinétiques au point de les rendre le plus souvent méconnaissables, on ne peut avoir grande confiance dans les résultats qu'ils donnent dans l'étude de la structure intime des cellules. Klein, (*Quart. Journ. of mic. Sc.*, 1878-79) et Eimer (*Arch. f. mik. Anat.*, 1871, 72, 75, 77) qui ont employé dans leurs recherches le chromate neutre d'ammoniaque, et le bichromate d'ammoniaque, ont décrit une structure compliquée de certaines cellules qui demanderait à être contrôlée à l'aide de réactifs plus fidèles. Nous nous rangeons entièrement à l'opinion de Flemming qui dit que « ceux qui cherchent à étudier la division cellulaire au moyen du bichromate de potasse et des autres sels de chrome font entièrement fausse route ».

Le bichromate d'ammoniaque peut cependant donner de bons résultats dans certains cas ; c'est ainsi que Ranvier (*Comptes rend. de l'Ac. des Sc.*, 1879) a pu établir les connexions qui relient entre elles les cellules du corps muqueux de Malpighi sur des pièces durcies par ce sel de chrome.

L'acide picrique, en solution concentrée ou diluée, est un bon agent de fixation ; il gonfle quelquefois légèrement le noyau, mais il conserve bien les figures karyokinétiques. Il vaut mieux employer des solutions fortes que des solutions faibles. Les sels picriques (de potasse, de soude ou de baryte) *ne valent rien* pour les études cytologiques.

L'alcool exerce sur les cellules à peu près la même action que l'acide chromique, mais il ratatine plus souvent les noyaux.

La solution d'acide nitrique d'Altmann, le liquide de Perenyi, le liquide de Kleinenberg, sont d'excellents fixateurs lorsqu'on veut simplement *constater la présence* de la cytodiérèse dans les tissus, mais ils conviennent moins bien pour l'étude spéciale de la division des noyaux.

Le meilleur agent pour fixer, en général, les cellules, soit à l'état de repos, soit en voie de division, est, d'après Flemming, le *mélange chromo-acéto-osmique*. Si, dans ce liquide, on ne met pas d'acide chromique, on n'obtient pas de bons résultats. Si l'on supprime l'acide acétique (comme dans la formule de Max Flesch), les figures nucléaires apparaissent bien moins nettement. La présence de l'acide

Digitized by Google

acétique ou de l'acide formique dans les solutions osmiques favorise la précision de la coloration ultérieure par le picro-carmin, l'hématoxyline et le violet de gentiane. Mais les mélanges d'acide osmique et d'acide acétique sans acide chromique (EIMER) ne donnent pas d'aussi bons résultats que le mélange chromo-acéto-osmique. Les mélanges d'acide picrique et d'acide osmique, ou d'acides picrique, osmique et acétique (acide picrique, 0,5 p. 100 ; acide osmique, 0,1 p. 100, acide acétique, 0,1 p. 100) fixent presque aussi bien que les mélanges chromiques, mais la coloration subséquente est encore plus difficile à obtenir qu'après le traitement par un mélange acéto-osmique. FLEMMING conclut de ses recherches que l'action favorable de l'acide osmique dans tous ces mélanges doit être attribuée à la rapidité avec laquelle il tue les éléments, les autres acides ayant pour fonction de rendre nettement *visible* la structure de ces éléments.

Les mélanges contenant de l'acide osmique doivent être employés toutes les fois qu'on désire fixer les figures chromatiques le plus fidèlement possible ; l'acide chromique pur s'emploiera quand il s'agira d'obtenir une coloration bien nette.

Pour l'étude des figures achromatiques, FLEMMING recommande le mélange chromo-acétique n° 45. Pour l'étude des corpuscules polaires, il recommande les mélanges osmiques, ou l'acide chromique pur, avec coloration par le violet de gentiane.

Nous admettons avec FLEMMING et avec la majorité des cytologistes que les mélanges chromo-acéto-osmiques sont en général les meilleurs de tous les agents fixateurs des cellules. Mais le lecteur sait qu'il y a plusieurs mélanges chromo-acéto-osmiques (sans compter le mélange de HERMANN). — FLEMMING lui-même en a indiqué deux, le *mélange faible* et le *mélange fort*. Le mélange fort avait été indiqué par FLEMMING en premier lieu à titre de réactif servant à différencier la chromatine cinétique de la chromatine au repos, et non comme réactif normal pour les travaux ordinaires. Laquelle de ces deux solutions doit être préférée pour les recherches cytologiques en général ? Je n'hésite pas à dire que, d'après mon expérience, c'est le *mélange fort*, et c'est bien là aussi l'expérience de la majorité des travailleurs.

A côté du mélange de FLEMMING vient le mélange de HERMANN, n° 71. L'opinion que j'ai exprimée dans ce paragraphe n'est pas sans être partagée par plus d'un naturaliste. Voyez aussi là-dessus l'opinion de FLEMMING (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 685), qui trouve que ce réactif donne une démonstration particulièrement nette des éléments achromatiques, mais que les mélanges chromo-acéto-osmi-

Digitized by Google

ques conservent mieux les éléments chromatiques. Il me paraît certain que le mélange de Hermann *durcit moins* que celui de Flemming, ce qui sera un avantage ou non selon les cas (les pièces sont moins cassantes et se coupent mieux). En somme, il y a entre ces deux liquides de légères différences dont on pourra à l'occasion faire son profit.

Pour l'étude des éléments achromatiques il me semble qu'il y a souvent avantage à diminuer la proportion d'acide organique dans l'un et l'autre de ces liquides, surtout dans celui de Hermann. Pour celui-ci on peut certainement la diminuer de moitié sans inconvénient.

Acide chromo-formique de Rabl, n° 46. *Chlorure platinique* de Rabl, n° 70.

Le *Liquide de* Perenyi donne quelquefois d'excellents résultats.

Dans ces derniers temps, M. Heidenhain (*Kern und Protoplasma*, 1892, p. 113) s'est élevé contre l'emploi trop exclusif du mélange de Flemming, et a préconisé l'emploi du sublimé corrosif (solution saturée à froid dans une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,5 p. 100). Cette solution aurait surtout l'avantage de pénétrer mieux que le liquide de Flemming. D'après mon expérience, cela est exact ; et il est exact aussi que le sublimé (je parle des solutions acides) donne souvent une fixation sensiblement aussi bonne sous le rapport de la conservation des formes. Mais il faut se rappeler qu'avec du matériel ainsi préparé on ne peut pas obtenir avec la safranine, le violet de gentiane, etc., les délicates différenciations que donnent ces couleurs après fixation par le mélange de Flemming.

Il va sans dire que d'autres fixateurs que ceux-ci trouvent bien leur emploi dans certains cas. Ainsi pour les œufs de l'*Ascaris*, l'alcool acétique de Carnoy, ou son mélange au chloroforme, etc.

607. Colorants de la chromatine. — Nous avons déjà parlé, numéro 604, de la coloration de la chromatine à l'état frais ou légèrement fixée. Nous avons ici à mentionner les colorants appropriés pour les pièces dûment fixées par les liquides recommandés dans le numéro précédent.

Nous avons, pour les pièces fixées aux mélanges chromiques, la *safranine*, le *violet de gentiane* ou le *bleu Victoria*, le *hémalun*, et d'autres encore. Ces couleurs donnant de bons résultats, il paraît inutile d'en augmenter la liste. Au point de vue de la précision de la coloration, le *carmalun* est à citer ici. Pour le matériel fixé au sublimé, etc., c'est certainement un excellent réactif. Mais pour le

Digitized by Google

matériel chromique je dois dire que je le trouve trop peu énergique. Le *vert de méthyle n'est pas* très recommandable pour les pièces destinées à être montées au baume, parce qu'il n'a pas une puissance de résistance suffisante à l'alcool de déshydratation. Il n'en possède pas davantage dans la combinaison Ehrlich-Biondi, combinaison qui, dans mon opinion, ne devrait être employée que dans certains cas très spéciaux.

La *Thionine* a été recommandée (par M. Heidenhain) comme donnant des colorations supérieures à celles de la safranine. L'auteur n'explique pas en quoi consiste cette supériorité. Et comme la thionine se trouve difficilement dans le commerce, il paraît inutile de s'en occuper.

608. Colorants plasmatiques. — Il n'en existe pas un seul de vraiment bon. Tous sont d'une électivité imparfaite, en ce que leur action ne se laisse pas limiter avec la précision et la certitude désirable à l'élément qu'on veut mettre en relief. Presque tous, par exemple, colorent l'enchylème plasmatique en même temps que le réticulum plastinien. Et, d'un autre côté, il y a des éléments importants de la cellule qui échappent en grande partie à l'action des colorants. Nous arrivons à colorer les fuseaux, il est vrai, mais à peine ; il a été impossible jusqu'ici de donner à ces éléments une coloration vraiment vigoureuse.

Le moins mauvais des colorants plasmatiques que je connaisse est le *Kernschwarz*. Voyez numéro 155.

Je crois qu'après le Kernschwarz le procédé qui m'a donné les meilleures images d'éléments plasmatiques est celui de Rawitz, numéro 171 *ter*. Puis le *Procédé à l'orange de Flemming*, numéro 246. Je le recommanderais surtout dans la modification élaborée par Reinke.

Le procédé *safranine-Lichtgrün* de Benda, numéro 245, donne souvent de beaux résultats. Mais il est évident qu'avec un procédé dans lequel la différenciation et la deuxième coloration ne durent ensemble que quelques secondes, les résultats doivent être assez aléatoires.

Quelques auteurs (M. Heidenhain, et d'autres) louent beaucoup la *fuchsine acide* (n° 189). Je lui reproche de donner des images plates, manquant de relief. Je lui préférerais souvent l'*orange* G.

Le mélange Ehrlich-Biondi-Heindenhain a été discuté aux numéros 251 et 252.

La *méthode au permanganate* de Henneguy a été donnée au numéro 171.

Digitized by Google

Les deux méthodes à l'hématoxyline de BENDA, numéros 146 *bis* et 146 *ter*, peuvent rendre des services.

La méthode à l'*alun de fer* de M. HEIDENHAIN, numéro 145, est très recommandable.

La méthode à l'*acide osmique et au pyrogallol* a été discutée au numéro 226. C'est une méthode de deuxième ordre et non de premier ordre.

Le carmin ferrique de ZACHARIAS, numéro 110 *bis*, m'a donné des résultats excellents sous quelques rapports : mais la coloration est toujours un peu faible.

Pour le « NEBENKERN » des spermatocytes, je recommande l'*hématoxyline à l'alun de fer* de M. HEIDENHAIN, la *safranine-Lichtgrün* de BENDA, et le procédé *acide osmique et pyrogallol.* Tous ces réactifs colorent ce corps d'une façon intense. Je recommande aussi le *Kernschwarz* qui donne des images excellentes, mais plus pâles ; ou le procédé Rawitz. Pour les vestiges de fuseaux en régression, soit corps de Platner et « Zellkoppel » de ZIMMERMANN (des spermatocytes des Pulmonés) je recommande toujours le *Kernschwarz* (*La Cellule*, XI, 1, 1895, p. 31), ou bien le procédé de Rawitz.

Voici le procédé recommandé par HERMANN (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 4, 1891, p. 583) pour l'étude de l' « Archoplasma » des spermatocytes de *Proteus*. — Les pièces sont colorées en masse à l'obscurité durant douze à treize heures dans une teinture composée de : hématoxyline, 1 ; alcool absolu, 70 ; eau, 30. Elles sont traitées durant un temps pareil par des alcools successifs, à l'obscurité, puis enrobées et coupées et les coupes sont collées sur porte-objets.

On les traite maintenant par une solution très faible (rose clair) de permanganate de potasse, jusqu'à ce que leur couleur passe du noir opaque à une teinte d'ocre. La marche de cette différenciation doit être contrôlée au microscope. On rince à l'eau et l'on traite par le liquide de Pal (acide oxalique, 1 ; sulfite de potassium (K^2SO^3), 1 ; eau, 200) allongé de 5 à 10 volumes d'eau, jusqu'à disparition de la couleur brune. Enfin on colore pendant trois à cinq minutes, pas plus, dans la safranine. Les préparations doivent montrer seuls les « granules de l'archoplasma » colorés par l'hématoxyline, le reste du protoplasma incolore, la chromatine rouge.

Noyau vitellin (cellule embryogène). *Méthode de* BALBIANI. (*Zool. Anzeiger*, VI, 1883, p. 659). — La vésicule embryogène se voit à l'état frais sans aucun réactif dans l'œuf de certains animaux, entre autres un grand nombre d'Arachnides et de Myriapodes. Pour

Digitized by Google

la faire apparaître plus nettement, on fait agir directement sur l'œuf, sous le champ du microscope, un mélange à parties égales d'acide acétique et d'acide osmique à 1 p. 100, auquel on ajoute une petite quantité de sel marin. Ce mélange rend les œufs moins granuleux que l'acide acétique dilué employé seul.

Pour les coupes, *méthode au permanganate* de HENNEGUY.

609. Granules ou « **Bioblastes** » d'ALTMANN. Pour la démonstration de ces objets, dont la nature paraît être assez problématique, voyez ALTMANN, *Studien über die Zelle*, 1886 ; *Die Elementarorganismen*, Leipzig, 1890 ; et un mémoire dans *Arch. f. Anat. u. Entwick.*, 1892, p. 223 ; aussi *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 199, et IX, 3, 1893, p. 331 ; puis L. et R. ZOJA, *Mem. R. Ist. Lombardo*, XVI, 3, VII, p. 237; FISCHER, *Anat. Anz.*, IX, 1894, numéro 22, page 678 (il pense que ces granules sont en partie du moins des précipités de peptone produits par les réactifs fixateurs).

610. Autres méthodes cytologiques générales. — STRASBURGER (*Arch. f. mik. Anat.*, XXI, 1881, p. 477). — USKOFF (*Arch. f. mik. Anat.*, XXI, 1882, p. 292). — PFITZNER (*Morphol. Jahrb.*, XI, 1885, p. 54). — TIZZONI, (*Bull. delle Sc. Med. di Bologna*, 1884, p. 259). — BAUMGARTEN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, I, 1884, p. 415). — BIZZOZERO (*ibid.*, III, 1886, p. 24). — BABES (*ibid.*, IV, 4, 1887, p. 470). — ZWAARDEMAKER (*ibid.*, IV, 2, 1887, p. 212). — NISSEN (*Arch. f. mik. Anat.*, 1886, p. 338). — SCHOTTLENDER (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXI, 1888, p. 426 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 515).

611. Cytologie de l'œuf. (a. *Ascaris*). — VAN BENEDEN (*Arch. de Biol.*, IV, 1883, p. 279). — CARNOY (*La Cellule*, II, 1, 1886, p. 17, 18 ; III, 1, 1886, p. 6 ; III, 2, 1887). — VAN BENEDEN et NEYT (*Nouv. Rech. sur la Féc.*, etc., à part, 1887, ou *Bull. Acad. roy. d. Sc. de Bruxelles*, 1887, III sér., XIV ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 508). — BOVERI (*Zellen-Studien* dans *Jen. Zeit. f. Naturw.*, XXI, 1887, p. 423, ou à part ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 664). — ZACHARIAS (*Anat. Anz.*, III, 1888, p. 24; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 663). — VAN GEHUCHTEN (*ibid.*, p. 237). — KULTSCHITZKY (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXI, 1888, p. 567). On trouvera un résumé de la partie technique de tous ces mémoires dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 367. HERLA (*Arch. de Biol.*, 13, 3, 1893 [4], p. 423).

(b. *Autres œufs*) HERTWIG, O. (*Morph. Jahrb.*, X, 1884, p. 338, *Rana*). — HERTWIG, O. und R. (*Jen. Zeit. f. Naturw.*, XIX, 1885, p. 124). — Fécondation de *Strongylocentrotus* (Echinodermata). — Aussi : *Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 4, 1886, p. 505, et *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 835. — BOVERI (*Zellen-Studien*, III [Echinodermata], in *Jen. Zeit. f. Naturw.*, XXIV, 1890, p. 314, ou à part.)

612. Spermatogenèse. — CARNOY (*La Cellule*, I, 1885, p. 209, Arthropodes). — GILSON (*Ibid.*, I, 1885, p. 40, 56, 58, 87, 121, 141, et II, 1886).

PICTET (*Mitth. a. d. Zool. Stat. Neapel.*, X, 1, 1891, p. 89) cite comme liquide additionnel pour les cellules fraîches la solution à

Digitized by Google

5 ou 10 p. 100 de *chlorure de manganèse* additionnée d'une faible quantité de dahlia. Je l'ai essayé et m'en suis bien trouvé.

Ces travaux donnent des renseignements utiles sur les procédés de dissociation, etc., pour l'étude de cellules fraîches. Pour les détails des méthodes de coupes qui ont été employées, voir les nombreux mémoires cités dans les rapports de HERMANN, dans *Ergebnisse der Anat.*, 1, (1891) 1892, p. 200, et II (1892), 1893, p. 201. A. citer parmi ceux-ci : BENDA, *Verh. d. anat. Ges.*, VII Vers., Göttingen, 1893, p. 161 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 1, 1894, p. 69. (Nous avons donné au numéro 146 *bis* la méthode de coloration recommandée.)

Digitized by Google

CHAPITRE XXVI

ORGANES TÉGUMENTAIRES

613. Tissu épithélial. — Pour des vues de surface des *épithéliums tégumentaires*, il est souvent d'une grande utilité, ou même quelquefois nécessaire, d'employer des imprégnations au nitrate d'argent. Nous renvoyons pour ce qui concerne ces manipulations à notre chapitre des « IMPRÉGNATIONS ». Le lecteur pourra également consulter avec fruit les excellentes instructions données par RANVIER (*Traité technique*, p. 246 et suiv.), de même que le mémoire de TOURNEUX et HERMANN (*Journ. de l'Anat.*, 1876, p. 200).

Les *coupes* se font très facilement d'après les méthodes communes. Le meilleur réactif durcissant pour la peau paraît être la solution de Müller. C'était déjà la conclusion de F.-E. SCHULTZE en 1867 (*Arch. f. mik. Anat.*, p. 145), et c'est celle de TIZZONI qui a fait les recherches les plus importantes sur cet organe (*Bull. delle Sci. med. di Bologna*, 1884, p. 259). D'après des observations récentes, le formol pourrait bien se montrer utile ici.

Pour les épithéliums *glandulaires*, il est souvent préférable d'employer un liquide chromique, ou l'acide osmique (voyez par exemple RANVIER, *loc. cit.*, p. 258 et suiv.) ou bien l'alcool absolu (BLAUE, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1884, p. 231) ; le liquide de Kleinenberg est moins bon.

Epithélium **cilié**, voyez numéro 763.

Les *macérations* se font : pour les épithéliums mous, avec un agent dissociant doux, tel que le sérum iodé, l'alcool au tiers, la salive, ou un mélange de salive et de solution de Müller (SCHULTZE), ou de salive avec 3 à 4 volumes de solution de sel de cuisine à 0,75 p. 100 (BIZZOZERO, *Intern. Monatsch. f. Anat.*, 1885, p. 278) ; —

Digitized by Google

pour les épithéliums durs, avec des dissociateurs énergiques, tels que la potasse à 40 p. 100.

Minot recommande une macération de quelques jours dans de la solution de sel de cuisine à 0,6 p. 100, additionnée de 0,1 p. 100 de thymol, procédé qui permet d'*isoler l'épiderme* des embryons, et rend des services dans l'étude du développement des poils (*Amer. Natural.*, XX, 1886, p. 575 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, VI, 1886, p. 872).

Mitrophanow (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 513) donne le procédé suivant : On fixe un embryon d'Axolotl pendant un quart d'heure dans de l'acide nitrique, à 3 p. 100, et on le met dans de l'alcool au tiers. Une heure après, l'épiderme commence à se séparer par places , et si maintenant on met l'embryon dans de l'alcool plus fort, on trouvera l'épiderme presque entièrement séparé au bout de vingt-quatre heures.

Pour le même but Blaschko, puis Loewy (*ibid.*, VIII, 2, 1891, p. 222) recommandent une macération de vingt-quatre heures ou plus à une température de 40° C. dans de l'acide pyroligneux à 6 p. 100. Cet auteur recommande également l'acide acétique à 0,3 p. 100 de Philippson (*ibid.*).

Dentelures et canaux intercellulaires des cellules de l'épiderme. — Outre la macération qui est une méthode des plus importantes pour l'étude de ces objets, les imprégnations peuvent rendre des services. Mitrophanow (*Zeit. wiss. Zool.*, 1884, p. 302, et *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1884, p. 191) recommande le procédé suivant (pour la queue des têtards d'Axolotl) : on rince la queue à l'eau distillée ; on la met pour une heure dans du chlorure d'or à 0,25 p. 100 avec une goutte d'acide chlorhydrique pour un verre de montre de la solution ; on lave et on réduit dans un mélange de 1 partie d'acide formique avec 6 parties d'eau.

A consulter surtout sur ce sujet les importants mémoires d'Ide (*La Cellule*, IV, 2, 1888, p. 409, et V, 2, 1889, p. 321). Ide s'est servi comme colorant plasmatique d'hématoxyline alunée. Je pense qu'il y aurait avantage à s'adresser à l'une ou l'autre des autres laques hématoxyliques (nos 143 à 148). Au lieu d'imprégnations métalliques, il semble indiqué de recourir plutôt à l'imprégnation au *bleu de méthylène*, voyez numéro 188. La méthode de Kromayer (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXIX, 1892, p. 141 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, I, 1892, p. 84, et IX, 3, 1893, p. 355), pour la démonstration de la « fibrillation protoplasmique des épithéliums », n'est qu'une application du procédé de Weigert pour la coloration de la *fibrine*. Kromayer procède ainsi :

Digitized by Google

On colore des coupes pendant cinq minutes dans une solution aqueuse concentrée de violet de méthyle 6 B (ou bien de violet de gentiane ou de Krystallviolett) allongée d'un volume égal d'eau anilinée. On les lave à l'eau et on les traite jusqu'à ce qu'elles soient devenues d'un noir bleu (une à trente secondes) par une solution d'iode dans l'iodure de potassium (solution de Lugol). On lave de nouveau à l'eau, on sèche avec du papier buvard, et on traite jusqu'à différenciation suffisante par un mélange de 1 volume d'huile d'aniline avec 2 volumes de xylol, puis par le xylol pur, après quoi l'on monte.

Pour le même objet, fibrilles des épithéliums, Unna (*Monatschr. f. prakt. Dermatol.*, XIX, 1894, p. 1, et p. 277 et suiv. ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XII, 1, 1895, pp. 61, 63) a donné toute une série de méthodes très minutieuses, dont nous faisons les extraits suivants :

1. *Wasserblau-Orcéine.* — Colorer des coupes pendant dix minutes dans une solution aqueuse neutre à 1 p. 100 de Wasserblau (bleu alcali), rincer à l'eau et colorer pendant cinq à dix minutes dans une solution alcoolique neutre à 1 p. 100 d'orcéine de Grübler. Déshydratation, essence, baume. Puis les variantes suivantes :

a. Dix minutes dans le Wasserblau, et trente minutes ou plus dans l'orcéine ;

b. Prendre pour la deuxième coloration une solution *acide* d'orcéine ;

c. Colorer seulement une minute dans le Wasserblau, mais trente ou plus dans l'orcéine neutre.

2. Colorer pendant une demi-heure ou plus dans une forte solution de hémalun, rincer, colorer une demi-minute dans une solution aqueuse saturée d'acide picrique, déshydrater (trente secondes) dans de l'alcool contenant 0,5 p. 100 d'acide picrique.

3. Hémalun comme ci-dessus (deux heures), orcéine neutre comme ci-dessus, dix à vingt minutes.

Outre ces méthodes, Unna en donne une demi-douzaine d'autres qu'il serait inutile de présenter au lecteur détachées de la partie théorique du travail d'Unna.

614. Poils, ongles. — Pour la dissociation, la solution de potasse à 40 p. 100 (il faut laisser macérer pendant un temps prolongé) ; ou bien faire chauffer avec l'acide sulfurique concentré. Voyez aussi v. Nathusius, *Zool. Anz.*, XV, 1892, p. 395.

Les tissus cornéfiés se laissent bien colorer par la safranine ou le

Digitized by Google

violet de gentiane. (Reinke, *Arch. f. mik. Anat.*, XXX, 1887, p. 183; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 1887, p. 383.)

615. Nerfs intra-épidermiques. — Ils doivent être étudiés par la méthode de l'or; voyez Ranvier (*Traité*, p. 900). Ranvier recommande l'emploi du mélange d'acide formique et de chlorure d'or dont nous avons parlé au n° 222. On fait bouillir ensemble 4 parties de solution de chlorure d'or à 1 p. 100, et 1 partie d'acide formique; on laisse refroidir le mélange. On prend de petits morceaux de peau, on les met pendant une heure environ dans ce mélange, et l'on effectue la réduction à la lumière du jour dans de l'eau légèrement acidulée par l'acide acétique. La réduction obtenue, on met les fragments dans l'alcool qui achève de les durcir, et qui a l'avantage d'arrêter la réduction ultérieure de l'or, ce qui fait que les préparations ne noircissent pas par la suite. On fait des coupes par les méthodes connues.

Wolters (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1893, p. 360) se sert de la coloration cylindraxile à l'hématoxyline que nous donnerons au chapitre xxix.

616. Ménisques tactiles du groin de Porc (Ranvier, *loc. cit.*, p. 910). — On les étudiera sur des coupes verticales du groin traité par la méthode du chlorure d'or avec l'acide formique que nous venons de donner, ou par la méthode du chlorure d'or avec le jus de citron dont nous donnerons le détail à propos de la cornée. On pourra également étudier par ces méthodes le groin de la Taupe, qui est un objet très commode.

617. Corpuscules tactiles (Fischer, *Arch. f. mik. Anat.*, 1875, p. 366). — Fischer employait la méthode à l'or de Lœwit, que nous avons données au n° 220. Cette méthode est également recommandée par Ranvier. Après avoir imprégné des morceaux de peau en bloc, on les durcit par l'alcool et on fait des coupes. On emploiera aussi l'acide osmique et le picrocarmin selon les procédés connus. Nous avons trouvé que les auteurs sont d'accord pour insister sur l'importance de ces deux réactifs dans ces recherches.

618. Corpuscules tactiles (Ranvier, *Traité*, p. 919). — Imprégnation par l'or, selon la méthode de l'acide formique (n° 615) ou selon la méthode du jus de citron que nous donnons à propos de la cornée. Faire des coupes et les colorer par le picrocarmin, la purpurine, l'hématoxyline, etc.

Digitized by Google

619. Corpuscules tactiles (Smirnow, *Intern. Monatsschr. f. Anat.*, etc., X, 1893, 6, p. 241 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 254). — L'auteur conseille le chlorure d'or de Löwit, et la méthode rapide au chromate d'argent de Golgi.

620. Corpuscules de Herbst et de Grandry (becs de Canards). — Dogiel (*Arch. f. Anat. u. Entw.*, 1891, p. 182 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 4, 1892, p. 520) conseille le procédé au bleu de méthylène. On injecte dans les vaisseaux de la tête une solution de bleu de méthylène à 4 p. 100, chauffée à 40° C. On enlève des lambeaux de peau du bec, on les monte dans de la moelle de sureau et on pratique des coupes. On met les coupes sur une lamelle et on les humecte d'humeur vitreuse ou aqueuse, additionnée de quelques gouttes d'une solution de bleu de méthylène à 1/16 p. 100, et on les laisse exposées à l'air. Après quelques minutes les terminaisons nerveuses sont colorées, et l'on fixe par le picrate d'ammoniaque (n° 186).

Geberg (*ibid.*, X, 2, 1893, p. 244) a également employé cette méthode. Il a employé aussi l'acide osmique simple, et le procédé au chlorure d'or d'Arnstein, qui est le suivant : des portions de peau sont mises pour vingt-quatre heures dans de l'eau de chaux, ce qui permet d'isoler la couche cornée. Cela fait, on coupe la peau en petits morceaux et on les met pour cinq minutes dans une solution de chlorure d'or à 0,25 p. 100. La réduction s'établit très rapidement, les pièces sont déjà brunes au bout de quelques minutes. On achève la réduction en les mettant pour vingt-quatre heures dans de l'eau distillée. Il se forme un précipité granuleux qu'on éloigne en mettant les pièces dans une solution de cyanure de potassium à 1/4 p. 100 et en brossant vigoureusement avec un pinceau. Alcool, essence, damar. Geberg, lui, employait le chlorure d'or à la dose de 0,5 p. 100 et le laissait agir pendant trente minutes.

Voyez aussi Carrière, *Arch. f. mik. Anat.*, 1882, p. 146 (réduction dans le liquide de Pritchard, n° 223).

621. Corpuscules de Meissner et de Krause de la cornée, conjonctive et paupières (Dogiel, *Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 602, et XLIV, I, 1894, p. 15). — Coloration par l'humeur aqueuse additionnée de bleu de méthylène comme nous l'avons dit aux n°s 184, 186, 620. Voyez aussi les méthodes de Longworth, *Arch. f. mik. Anat.*, 1875, p. 655.

622. Poils tactiles (Ranvier, *Traité*, p. 914). — Ranvier recom-

Digitized by Google

mande la méthode du chlorure d'or à l'acide formique (n° 615). Après avoir isolé les bulbes et en avoir incisé la capsule, on les maintient pendant une heure environ dans le mélange de chlorure d'or et d'acide formique, on réduit dans de l'eau légèrement acétifiée, on durcit à l'alcool et l'on fait des coupes longitudinales et transversales.

623. Langue de la Grenouille (disques terminaux), FAJERSTAJN (FEUERSTEIN), *Arch. de Zool. exp. et gén.*, VII, 1889, p. 705). Bleu de méthylène. **Langue du Lapin,** von LENHOSSEK, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 3, 1894, p. 377. Chromate d'argent de GOLGI (imprégnation double de RAMÒN Y CAJAL). Hématoxyline chromique de HEIDENHAIN. **Papillæ foliatæ du Lapin,** HERMANN, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 524. **Organes olfactifs de Vertébrés,** DOGIEL, *Arch. f. mik. Anat.*, 1887, p. 74. **Organes d'un « sixième sens » chez les Amphibiens,** MITROPHANOW, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 513 (détails sur la coloration au « Wasserblau », pour lesquels voyez aussi *Biol. Centralb.*, VII, 1887, p. 175).

624. Cornée. — Les imprégnations à l'or et à l'argent sont indispensables pour l'étude de la cornée.

On obtient facilement des images négatives des cellules fixes de la cornée par la méthode de l'imprégnation avec le nitrate d'argent en nature (KLEIN). Il faut enlever l'épithélium conjonctival sur une cornée vivante, et passer à plusieurs reprises, sur la surface de la cornée mise à nu, un crayon de nitrate d'argent. Après une demi-heure environ, on peut exciser la cornée et la soumettre à l'observation dans l'eau distillée.

Pour obtenir des images positives des cellules fixes, RANVIER (*Traité*, p. 863) recommande de faire macérer deux ou trois jours dans l'eau une cornée dans laquelle on a déterminé d'abord une imprégnation négative au nitrate d'argent. On obtient une imprégnation secondaire, positive, qui donne des images très nettes et élégantes.

On obtient les mêmes résultats en cautérisant une cornée avec le crayon et en la laissant en place, sur l'animal vivant, pendant deux ou trois jours, ou bien en traitant par une solution diluée de chlorure de sodium ou d'acide chlorhydrique une cornée à laquelle on a fait subir une imprégnation négative (HIS).

Mais les meilleures images positives sont celles que fournit le chlorure d'or. RANVIER (*Traité*, p. 864) recommande de procéder de la manière suivante. La cornée détachée est posée pendant cinq minutes dans du jus de citron fraichement exprimé et filtré sur de la flanelle.

Digitized by Google

On la porte ensuite pendant un quart d'heure environ dans une solution de chlorure double d'or et de potassium à 1 p. 100, et l'on obtient la réduction à la lumière du jour dans de l'eau acétifiée (2 gouttes d'acide acétique pour 50 cc., *Traité*, p. 813). Il importe que le séjour de la membrane dans la solution d'or ne soit pas trop long; car, au delà d'une certaine limite qui, en général, ne dépasse pas vingt-cinq minutes, l'imprégnation porte seulement sur les nerfs, et les cellules fixes ne sont plus colorées que d'une façon incomplète.

Les nerfs de la cornée doivent être étudiés par la même méthode :

Rollett (*Stricker's Handbuch*, p. 1115) recommande une imprégnation double par l'argent suivi de l'or, pour obtenir l'imprégnation *négative* par l'or. On traite une cornée *pendant très peu de temps* par une solution de nitrate d'argent à 0,5 p, 100, on opère la réduction et l'on met la cornée dans une solution de chlorure d'or à 0,5 p. 100. La coloration brune de l'argent disparaît aussitôt que la cornée est placée dans la solution d'or; après quelques minutes, on expose la préparation à la lumière dans l'eau acétifiée. L'or s'y réduit rapidement; et à la place de la coloration brune de l'argent, la substance fondamentale prend la coloration violette de l'or. Les cellules fixes sont cependant toujours visibles, reconnaissables à leur aspect granuleux et à leur coloration jaune.

Renaut (*Comptes rendus*, 1880, p. 137) procède ainsi : acide formique, 20 p. 100, dix minutes; chlorure d'or, 1 p. 100, vingt-quatre heures: acide formique au tiers, vingt-quatre heures.

Voyez aussi la méthode de Ciaccio, *Arch. ital. de Biol.*, III, p. 75, et celle de Hoyer (n° 223). Pour la très importante *méthode au bleu de méthylène*, voyez numéro 188.

625. Cornée, autres méthodes (Rollett. *Stricker's Handbuch*, p. 1102). — Rollett recommande particulièrement le procédé suivant : on met une cornée fraîchement extirpée dans une chambre humide où on l'expose aux vapeurs d'iode. Aussitôt qu'elle est devenue brune, on pourra enlever l'épithélium. Si la réaction n'est pas complète, on remet la cornée dans la chambre humide et l'on continue l'action de l'iode. Lorsque la préparation aura absorbé une quantité suffisante d'iode, on pourra l'examiner, et l'on trouvera alors le réseau de cellules fixes démontré avec une évidence qui ne le cède guère à celle des préparations faites par l'or. Cette méthode possède l'avantage de ne jamais manquer, ce qui n'est malheureusement pas le cas avec l'or. La méthode est également admirable sous le rapport de la bonne fixation des cellules.

Digitized by Google

Macération. — Pour la dissociation des fibres, ROLLETT recommande la macération dans une solution de permanganate de potasse, additionnée ou non d'alun. Aussitôt que le tissu est bruni, on l'agite dans une éprouvette avec de l'eau.

Méthode de TARTUFERI (*Anat. Anz.*, V, 1890, p. 524 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1890, p. 365, et XI, 3, 1894, p. 346).

626. Cristallin ; durcissement (LŒWE, *Arch. f. mik. Anat.*, 1878, p. 557). — Mettre un bulbe frais dans *plusieurs litres* de solution de bichromate de potasse à 1 p. 100 ; changer la solution fréquemment en en augmentant graduellement la concentration jusqu'à avoir une solution saturée. Après être resté dans cette solution au moins *un an et demi*, le bulbe aura acquis une consistance permettant de faire des coupes.

Macération. — Acide sulfurique de MAX SCHULTZE (n° 516).

Digitized by Google

CHAPITRE XXVII

MUSCLES ET TENDONS; LEURS TERMINAISONS NERVEUSES

A. — MUSCLES STRIÉS

627. Cellule musculaire. — Consulter entre autres BEHRENS, KOSSEL und SCHIEFFERDECKER, *Das Mikroskop.*, II, pages 154-161; SCHÆFER, *Proc. Roy. Soc.*, XLIX, 1891, p. 280; ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 683.

628. Sarcolemme. — Outre les sources citées dans le numéro précédent, consulter SOLGER, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1889, p. 189 (de petites portions de tissu musculaire frais sont dissociées et étudiées dans de la solution de carbonate d'ammoniaque saturée à froid).

629. Coupes (ROLLETT, *Denkschr. math. naturw. Kl. k. Acad. Wiss. Wien*, 1885; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 92). — Outre les méthodes ordinaires des coupes, nous rappelons les procédés suivants de Rollett, comme pouvant rendre des services pour l'étude de la structure intime de ce tissu difficile : — 1° La méthode de la congélation du tissu frais, c'est-à-dire vivant, dans le blanc d'œuf, que nous avons donnée au n° 315. — 2° La même méthode pour des muscles fixés, pourvu qu'ils n'aient pas séjourné trop longtemps dans l'alcool. — 3° Pour les muscles qui ont été plus longtemps dans l'alcool, Rollett préfère la celloïdine.

630. Dissociation. — Voyez au chapitre XXIII, et surtout au n° 515.

LANGERHANS (*Arch. f. mik. Anat.*, 1875, p. 291) conseille de faire macérer l'Amphioxus dans l'acide nitrique à 20 p. 100. On dissocie facilement ainsi

Digitized by Google

les plaques musculaires. En laissant macérer un animal entier pendant trois jours, et en agitant ensuite vigoureusement dans l'eau, on peut dégager le système nerveux en totalité, jusqu'aux ramifications périphériques les plus fines des nerfs.

631. Terminaisons nerveuses, bleu de méthylène. — Le procédé de Biedermann pour les muscles d'*Astacus* a été indiqué au n° 184. Les muscles qui donnent les meilleurs résultats sont les abdominaux et les caudaux. Après imprégnation de la manière que nous avons dite, la carapace doit être ouverte et les muscles exposés à l'air dans une grande chambre humide pendant deux à six heures, afin que la coloration puisse se différencier. Voyez aussi *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 1, 1889, page 65.

Pour l'*Hydrophilus piceus*, Biedermann injectait 0.5 cc. de solution de bleu de méthylène entre les deux derniers somites abdominaux, à travers le sillon ventral, et gardait les animaux en vie dans l'eau pendant trois ou quatre heures. Puis il ouvrait le thorax au moyen de deux incisions latérales, enlevait les muscles de la première paire de pattes, et les traitait comme nous avons dit pour l'*Astacus*.

Gerlach (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1880, p. 220) injectait à des Grenouilles (par la veine abdominale ou l'aorte) 4 à 5 cc. d'une solution à 1 p. 400 dans de la solution saline à 1 p. 100 et étudiait ensuite des portions de muscle (de la tête et des yeux surtout) dans du sérum de l'animal, fixait au picrate d'ammoniaque, et montait dans de la gélatine glycérinée.

La méthode de Dogiel a été donnée au n° 184.

632. Terminaisons nerveuses, le chromate d'argent de Golgi. — Cette méthode a été appliquée avec fruit par Ramòn y Cajal à l'étude des terminaisons des nerfs et des trachées dans les muscles des Insectes (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1890, p. 332). Le muscle frais est mis pendant douze à vingt-quatre heures dans un mélange de 20 parties de solution de bichromate de potasse à 3 p. 100 et 5 parties d'acide osmique à 1 p. 100. Il est mis ensuite dans le nitrate d'argent à 0.75 p. 100 pour un jour, et passé ensuite par l'alcool et l'essence de girofle pour être monté dans la térébenthine résinifiée.

633. Plaques motrices (Ranvier, *Traité*, p. 813). — Pour les Batraciens, Reptiles, Poissons, Oiseaux et Mammifères, Ranvier trouve que la méthode du chlorure d'or au jus de citron donne des résultats meilleurs que la méthode du chlorure d'or à l'acide formique, et de beaucoup supérieurs à ceux que donne la méthode de Lœwit. Les élé-

Digitized by Google

ments délicats du *buisson de Kühne* sont beaucoup mieux ménagés que par le procédé de Lœwit.

Voici le mode opératoire : jus de citron fraichement exprimé et filtré sur de la flanelle, cinq à dix minutes ; laver à l'eau ; chlorure d'or à 1 p. 100, vingt minutes ; laver ; réduire à la lumière pendant vingt-quatre à quarante-huit heures dans un mélange de 50 cc. d'eau et deux gouttes d'acide acétique ou bien (ce qui vaut mieux pour la permanence des préparations) dans l'acide formique au quart, à l'obscurité. Monter dans la glycérine pure ou additionnée d'acide formique.

La méthode de l'or donne des images *positives*, les structures nerveuses étant colorées en un violet plus ou moins foncé. Il convient de compléter l'étude par la méthode de l'argent, qui donne des images *négatives*, le buisson de Kühne étant réservé en blanc sur fond coloré en brun.

Le mode opératoire est le suivant : on dissocie soigneusement dans du sérum frais de l'animal quelques faisceaux musculaires du gastrocnémien d'une Grenouille. On les traite pendant dix à vingt secondes par une solution de nitrate d'argent de 2 à 3 p. 1000. On réduit dans l'eau distillée, à la lumière du jour et directement au soleil, si c'est possible. Puis on porte les pièces dans l'acide acétique à 1 p. 100, jusqu'à ce que, se gonflant peu à peu, elles aient repris les dimensions qu'elles avaient avant d'avoir été ratatinées par l'action du nitrate d'argent. On monte dans un mélange à parties égales d'eau et de glycérine.

634. Plaques motrices. — Autres méthodes. — Fischer, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 365. — Bremer, *Arch. f. mik. Anat.*, 1882, p. 195. — Ciaccio, *Journ. de Micrographie*, 1883, p. 38 ; *Arch. Ital. de Biol.*, III, p. 75. — Mays, *Zeit. f. Biol. von Kühne u. Voit*, 1884, p. 449 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 242. — Wolff, *Arch. f. mik. Anat.*, 1881, p. 355. — Krause, *Intern. Monatsch. f. Anat. u. Hist ; Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 547. — Negro, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 2. 1888, p. 240. — Boccardi, *ibid.*, IV, 4, 1887, p. 492. — Kühne, *ibid.*, p. 495 ; *Zeit. f. Biol.*, XXIII, V, 1887, p. 1 (revue critique des diverses méthodes au chlorure d'or). — Marshall, *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1890, p. 73 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 404. — Golgi, *Mem. R. Accad. Sc. di Torino*, II, 32. — Trinchese, *Mem. R. Accad. Ist. Bologna*, 5, 11, p. 279 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*. IX, 2, 1892, p. 238.

TERMINAISONS NERVEUSES DANS LES TENDONS

635. Corpuscules de Golgi (Ranvier, *Traité*, p. 929). — On les met facilement en évidence en traitant par le mélange de chlorure d'or et d'acide formique le tendon d'insertion antérieur et supérieur

Digitized by Google

des muscles jumeaux du Lapin, après qu'on l'a enlevé avec une couche aussi mince que possible des fibres musculaires qui y adhèrent. Lorsque la réduction de l'or est opérée, on racle le tendon avec un scalpel afin de le débarrasser des fibres musculaires qui masquent les organes « musculo-tendineux ».

636. Corpuscules de Golgi (Marchi, *Arch. per le science med.*, V, n° 15). — On met des yeux, soigneusement énucléés avec leurs muscles moteurs du bulbe oculaire et leurs tendons dans du bichromate de potasse à 2 p. 100, où ils restent au moins trois jours. On isole alors les muscles et leurs tendons, et les traite par le chlorure d'or et l'acide osmique (Golgi), ou par les méthodes suivantes, dues à Manfredi :

1. Les muscles et tendons sortis du bichromate sont mis pendant une demi-heure dans une solution d'acide arsénique, ou dans l'acide acétique à 1 p. 100. On les met ensuite dans du chlorure d'or, 1 p. 100, pendant une demi-heure ; on les lave, et on opère la réduction à la lumière du soleil, jusqu'à production d'une coloration violette foncée, dans de l'acide arsénique à 1 p. 100, qu'on renouvelle à mesure qu'il brunit.

2. *Méthode de* Marchi. — Les muscles et les tendons sortis du bichromate sont traités par l'acide arsénique, 1 p. 100, demi-heure ; et l'acide osmique, 1 p. 100, cinq à six heures.

3. Les muscles et les tendons frais sont traités par le chlorure d'or, 1 p. 100, demi-heure ; acide oxalique, 0,5 p. 100 ; chauffer à 36° au bain-marie, laisser refroidir, et examiner dans la glycérine.

Toutes ces préparations doivent être montées à la glycérine. Ces méthodes ne réussissent que par un temps clair.

637. Corpuscules de Golgi, **autres méthodes.** — Pour les Amphibies, voir Ciaccio, *Mem. R. Acc. Sci. Bologna*, X, 1890, p. 301 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 507. Pour les Amphibiens les procédés usuels au chlorure d'or ne sont pas satisfaisants, parce qu'ils imprègnent la substance fondamentale du tendon en même temps que les terminaisons nerveuses. Des portions de tendons doivent être mises dans de l'acide chlorhydrique à 0,1 p. 100 ou dans de l'acide acétique à 0,2 p. 100 jusqu'à transparence parfaite. On les porte alors dans un mélange contenant 0,1 p. 100 de chlorure d'or et 0,1 p. 100 de chlorure de potassium. Après cinq minutes on les remet dans l'acide acétique, où on les laisse pendant un jour à l'obscurité et ensuite pendant deux à trois jours au soleil. Lorsqu'elles sont deve-

Digitized by Google

nues violacées on les met pour un jour dans de l'acide osmique à 0,1 p. 100 et l'on monte dans de la glycérine acidifiée.

TISSU MUSCULAIRE LISSE

638. Muscle lisse, réaction. — Pour distinguer les muscles lisses des fibres de tissu conjonctif, RETTERER (*Comptes rend. Soc. Biol.*, IV, 1887, p. 645) fixe des portions de tissu dans un mélange de 10 volumes d'alcool à 90 p. 100 et un volume d'acide formique, lave bien, et colore pendant vingt-quatre à trente-six heures dans le carmin à l'alun. Muscle lisse, rouge, cellules conjonctives incolores et gonflées.

639. Muscles lisses ; dissociation (SCHWALBE, *Arch. f. mik. Anat.*, 1868, p. 394). — Macération dans l'acide chromique de 0,02 p. 100. Ce réactif serait à préférer aux autres macérateurs, pour cet objet, parce qu'il conserve mieux la structure intime des cellules.

Le mélange de GAGE a été donné au n° 510.

640. Muscle dilatateur de la pupille (DOGIEL, *Arch. f. mik. Anat.*, 1870, p. 91). — Ce muscle est difficile à préparer à cause de la pigmentation de l'iris. Dogiel a obtenu les meilleurs résultats en opérant ainsi : un iris est mis pendant douze heures dans de l'acide acétique fort, ou mieux (*ibid.*, 1886, p. 403) pendant plusieurs jours dans un mélange de deux parties d'alcool au tiers avec une partie d'acide acétique à 0,5 p. 100. On le nettoie avec un pinceau, et on en fend le bord avec la pointe d'un scalpel. Il devient alors possible de séparer de la surface antérieure le tissu conjonctif et les vaisseaux, et de la surface postérieure le tissu conjonctif, en partie du moins, les vaisseaux et le pigment. On colore la préparation selon les méthodes connues.

Le traitement par l'acide chromique à 0.01 p. 100, le chlorure d'or à 0.1 p. 100, ou le chlorure de palladium, a l'avantage de donner à l'iris une consistance qui rend plus facile sa division.

A consulter aussi, KOGANEI, *ibid.* ; 1885, page 1 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, page 874 ; CANFIELD, *Arch. f. mik. Anat.*, 1886, page 121 ; DOSTOIEWSKY, *ibid.*, page 91.

641. Vessie de la Grenouille, distribution nerveuse (RANVIER, *Traité*, p. 854). — Ranvier recommande d'employer soit la méthode du chlorure d'or au jus de citron, soit celle du chlorure d'or

Digitized by Google

à l'acide formique pour les deux. Lier le cloaque aussi bas que possible ; injecter, par une petite incision longitudinale pratiquée dans le rectum, soit du jus de citron, soit le mélange de chlorure d'or et d'acide formique, suivant le procédé qu'on a choisi. On pose alors une ligature au delà de la canule, on enlève les parties distendues pour les mettre pendant une demi-heure dans la solution de chlorure d'or, on ouvre la vessie dans l'eau distillée, on la lave, et on opère la réduction à la lumière dans un flacon renfermant 50 cc. d'eau distillée et trois gouttes d'acide acétique.

Voyez aussi Wolff, *Arch. f. mik. Anat.*, 1881, page 362 ; Bernheim, *Arch. f. Anat. u. Phys. Phys., Abth.*, 1892, Supp., page 29 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, page 484 ; Gscheidlen, *Arch. f. mik. Anat.*, 1877, page 325 ; Tolotschinoff, *ibid.*, 1869, page 509 ; Flemming, *Zeit. f. wiss. Zool.*, XXX, Supp., page 468.

Digitized by Google

CHAPITRE XXVIII

RÉTINE, OREILLE INTERNE

RÉTINE

642. Fixation de la rétine. — L'acide osmique est le réactif par excellence pour l'étude de la rétine. Quoique, même récemment, nous voyions çà et là des anatomistes (par exemple DENNISSENKO, *Arch. f. mik. Anat.*, 1881, p. 395) employer des mélanges chromiques simples pour la fixation et le durcissement de la rétine, nous sommes convaincu que pour les coupes aucun réactif ne saurait être comparé à l'acide osmique, car ce réactif est le seul connu qui conserve d'une manière fidèle les éléments nerveux si délicats de cet organe.

On peut l'employer en solution ou en vapeur. D'après RANVIER (*Traité*, p. 954), on peut fixer la rétine d'un Triton en exposant l'œil entier aux vapeurs d'une solution à 1 p. 100 d'acide osmique pendant dix minutes. La sclérotique étant extrêmement mince chez cet animal, il n'est pas nécessaire d'ouvrir l'œil en premier lieu.

Des yeux pas trop gros peuvent être également fixés dans les solutions avant d'être ouverts ; on pourra procéder ainsi avec des yeux de Mouton ou de Veau. Mais il nous semble qu'il est toujours préférable d'ouvrir l'œil par une incision équatoriale, et de dégager l'hémisphère postérieur avant de le mettre dans la solution.

Pour les coupes, on doit toujours fixer et durcir dans des solutions *fortes* à 1 p. 100, ou, ce qui vaut encore mieux, à 2 p. 100. Les solutions fortes conservent parfaitement toutes les structures de la rétine, ce qui n'est pas le cas avec les solutions faibles. Il faut laisser agir les solutions de six à vingt-quatre heures ; nous recommandons plutôt le temps plus court.

Les lignes précédentes demeurent comme elles étaient dans la Première Édition, je ne vois rien à y changer. Voici maintenant quelques

Digitized by Google

indications supplémentaires (inédites), pour lesquelles nous avons bien de l'obligation à M. LINDSAY JOHNSON. — Les meilleurs résultats en général s'obtiennent en fixant le bulbe oculaire entier pendant cinq minutes dans les vapeurs d'une solution d'acide osmique à 2 p. 100 chauffée presque à ébullition. Ou bien, pour des yeux *adultes* de l'Homme, en enlevant la cornée et le cristallin et injectant dans la cavité de la vitreuse quelques gouttes d'un mélange à parties égales d'acide acétique et solution d'acide osmique à 2 p. 100. Après fixation les yeux doivent être lavés pendant un quart d'heure dans de l'alcool, et mis pour douze heures dans le mélange n° 58. On les lave ensuite dans de l'eau courante et on les suspend pour deux jours dans un volume considérable de solution de bichromate de potasse à 2,5 p. 100 et enfin on les fait passer par les alcools usuels.

Ce procédé est pour les yeux plutôt gros. Pour des yeux d'enfants et de petits animaux, tels que Lapins et Rats, et surtout pour les yeux fœtaux, il faut des précautions spéciales ; sans cela, en conséquence de la faible quantité de tissu conjonctif et la ténuité de la sclérotique, la rétine se plissera et le bulbe s'affaissera. De tels yeux ne doivent jamais être ouverts avant que la fixation ne soit totalement achevée. Il faut les exposer entiers aux vapeurs d'osmium comme nous l'avons dit pendant deux à trois minutes, et les mettre entiers pour trois à six heures dans du liquide de Flemming ou de Hermann ou dans le mélange n° 58, puis dans la solution de bichromate ; et les bulbes ne doivent pas être ouverts avant deux ou trois jours. On obtient aussi de bonnes préparations en fixant dans un mélange de formol (à 15 p. 100 d'aldéhyde formique) avec 5 p. 100 de chlorure platinique à 2 p. 100.

Voyez aussi : KÜHNT, *Jen. Zeit.*, XXIV, 1, 1889, p. 177 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 1, 1890, p. 65 ; BARRETT, *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1886, p. 607 ; SCHIEFFERDECKER, *Arch. f. mik. Anat.*, 1886, p. 305 ; CUCCATI, *Mem. R. Ac. Sc. Bologna ; Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 1; 1886, p. 86 ; CHIEVITZ, *ibid.*, VI, 4, 1889, p. 511 ; DENNISSENKO, *Arch. f. mik. Anat.*, 1891, p. 395 : ANGELUCCI, *Moleschott's Untersuchungen*, XVI, 1890, p. 231 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 85.

643. Coloration. — RAMÒN Y CAJAL emploie la *méthode rapide* de Golgi au chromate d'argent. Nous donnons ce procédé plus loin (n° 652). De même KALLIUS, voyez n° 653.

KUHNT (n° 642) emploie l'hématoxyline de PAL, que nous donnons également plus loin.

DOGIEL emploie le bleu de méthylène, selon le procédé des n°s 184, 186, 188.

Digitized by Google

SCHAFFER (*Sitzb. k. Acad. Wiss. Wien*, 1890, p. 110 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 2, 1891, p. 227) recommande de mordancer des coupes pendant douze heures dans de l'acide chromique à 1 p. 100, de laver peu de temps à l'eau, de colorer pendant vingt heures dans l'hématoxyline acide de Kultschitzky (voir plus loin), et de différencier pendant douze heures dans le liquide ferricyanique de Weigert (voir plus loin).

KRAUSE (*Intern. Monatschr.*, 1884, p. 225) employait une coloration au perchlorure de fer ou de vanadium suivie de tannin ou d'acide pyrogallique.

LENNOX (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 389) employait l'hématoxyline de Weigert.

Voyez aussi les méthodes de BERNHEIMER dans *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 167.

COLUCCI (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XII, 1, 1895, p. 87) recommande avant tout l'iodure de palladium de Paladino (n° 670).

644. Dissociation de la rétine. — Pour les dissociations, il faut fixer avec des solutions faibles d'acide osmique (0,2 à 0,5 p. 100), ou bien pendant un temps plus prolongé avec des solutions plus fortes, les bulbes n'étant pas incisés. THIN (*Journ. of Anat. and Physiol.*, 1879, p. 139) recommande (pour la dissociation des fibres nerveuses) de fixer pendant trente-six à quarante-huit heures dans l'alcool au tiers, ou au quart, ou à 45 p. 100. On peut faire macérer les pièces fixées par l'osmium dans l'acide chromique à 1/50 p. 100 (M. SCHULTZE) ou dans le sérum iodé (SCHULTZE) ou dans l'alcool dilué (LANDOLT), ou enfin dans l'eau pure pendant deux ou trois jours (RANVIER, *Traité* p. 957).

KRAUSE (*Intern. Monatschr. f. Anat. u. Hist.*, 1884. p. 225 ; *Zeit. f. wiss. Mik.* 1885, p. 140, 396) recommande, pour les dissociations par les aiguilles, de traiter la rétine (fraîche ou fixée?) pendant plusieurs jours par une solution d'hydrate de chloral à 10 p. 100. SCHIEFFERDECKER emploie le procédé décrit au n° 518.

OREILLE INTERNE

645. Limaçon de Cobaye. — SCHWALBE (*Beitr. z. Phys.*, 1887 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 840). Fixer pendant huit à dix heures dans le mélange de Flemming, décalcifier pendant vingt-quatre heures dans de l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, laver, déshydrater et couper à la paraffine.

Digitized by Google

La méthode de PRENANT (*Intern. Monatschr.*, IX, I, p. 6) est la suivante : pour les coupes, ouvrir le limaçon dans du liquide de Flemming ou de Hermann, et y fixer pendant quatre à cinq heures. Éviter la décalcification autant que possible ; mais, si elle est nécessaire, la faire dans du chlorure de palladium à 1 p. 100. Faire des coupes à la paraffine, et colorer dans la safranine ou dans le violet de méthyle B, ou par le vert d'aniline et l'orange ou par l'éosine hématoxylique de Renaut.

Des préparations isolées de la Stria vascularis peuvent être obtenues en mettant un limaçon pour un jour dans de l'acide osmique à 1 p. 100, puis pour quatre à cinq jours dans une solution également d'acide osmique à 0,1 p. 100 ; la stria se laisse alors enlever intégralement.

VON LENHOSSÈK (*Anat.*, Hft III, 1893, 2, p. 231 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 503). — Pour l'étude des Maculæ et Cristæ acusticæ (mais pas pour l'organe entier de Corti), VON LENHOSSÈK prend des Souris jeunes, nouveau-nés, ou de quelques jours, jusqu'à dix jours. Il enlève le toit du crâne, le cerveau et les mâchoires inférieures, et soumet la base cranienne entière à l'imprégnation chromo-argentique de GOLGI. Le procédé particulier qu'il emploie est celui de l'imprégnation double de RAMÒN Y CAJAL (voir plus loin). Il ne décalcifie pas : ce n'est pas nécessaire ; mais il colle les pièces imprégnées sur un liège avec de la celloïdine et les coupe au microtome dans de l'alcool à 80 p. 100, éclaircit à l'essence et monte au damar sans verre à couvrir.

FERRERI (*Bull. R. Accad. Med. Roma*, 1892, p. 67 ; *Zeit, f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 236) emploie pour la décalcification du labyrinthe la solution suivante : 1 gramme de phloroglucine dissous à chaud dans 100 grammes d'eau avec 10 grammes d'acide chlorhydrique, et la solution additionnée, après refroidissement, de 200 grammes d'alcool à 70 p. 100. Il n'y met que des pièces préalablement fixées.

A consulter aussi : POLITZER, *Die anatomische und histologische Zergliederung des menschlichen Gehörorganes*, Stuttgart, Enke, 1889 (compte rendu dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1890, p. 364). — EICHLER, *ibid.*, IX, 3, 1893, p. 380 (instructions détaillées pour l'injection des vaisseaux sanguins du labyrinthe). — SIEBENMANN, *Die Blutgefässe im Labyrinthe des menschlichen Ohres*, Wiesbaden, Bergmann, 1894 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 3, 1894, p. 386). — WALDEYER, *Stricker's Handbuch*, 1872, p. 958. — URBAN PRITCHARD, *Proc. Roy. Soc.*, n° 168 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1876, p. 211. — LAVDOWSKY, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 497. — MAX FLESCH, *Arch. f. mik. Anat.*, 1878, p. 300. — TAFANI, *Arch. Ital. de Biol.*, VI, p. 207.

Digitized by Google

CHAPITRE XXIX

NERFS PÉRIPHÉRIQUES[1]

646. Topographie des nerfs périphériques. Leurs terminaisons. — On peut se servir pour ces études de l'une ou l'autre des méthodes pour l'emploi du chlorure d'or que nous avons données au chapitre des *Imprégnations* et dans les chapitres XXVI et XXVII ; on peut également employer avec fruit, surtout pour les études topographiques, la méthode de FREUD, que nous donnerons au chapitre des *Centres nerveux*. (Cette méthode a été modifiée pour les nerfs périphériques par BECKWITH, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 894, par l'intercalation entre le traitement par la soude et le traitement par l'iodure de potassium d'un traitement pendant trente minutes par une solution à 10 p. 100 de carbonate de potasse.)

Mais aujourd'hui c'est surtout à la *méthode au bleu de méthylène* et à l'imprégnation chromo-argentique de GOLGI (*méthode rapide*) que l'on s'adresse dans ce genre de recherches. Nous avons déjà traité de la méthode du bleu de méthylène dans le chapitre XI. Nous allons maintenant exposer en détail *la méthode de Golgi*.

Mais avant de le faire nous placerons déjà ici un mot sur le caractère particulier de cette imprégnation. Les préparations obtenues par le procédé de GOLGI ne ressemblent pas du tout aux teintures et diffèrent même beaucoup des imprégnations ordinaires à l'argent ou à

[1] La classification employée pour la distribution de la matière en ce chapitre et le suivant est défectueuse. En effet, plus d'une des méthodes décrites en ce chapitre se laissent mettre à profit pour l'étude du Système nerveux central. Ainsi, pour n'en citer qu'une, l'imprégnation chromo-argentique de GOLGI. Et d'un autre côté plusieurs des procédés du chapitre suivant peuvent servir pour l'étude d'organes périphériques. C'est à tort qu'on a dit que l'hématoxyline de WEIGERT ne peut pas y être appliquée. Mais quelque imparfaite qu'elle soit nous pensons que notre classification servira à orienter le lecteur.

Digitized by Google

l'or. Les préparations réussies ne présentent que des imprégnations *partielles*, c'est-à-dire que de tous les éléments, nerveux ou autres, qui sont présents dans la préparation, seuls un *petit nombre* se montrent colorés. C'est là l'avantage particulier de cette méthode. Si tous les éléments étaient colorés à titre égal avec l'intensité avec laquelle ils se colorent par ce procédé, on ne distinguerait plus rien dans la préparation. Mais l'imprégnation de Golgi fait élection. Elle choisit dans les tissus un petit nombre d'éléments nerveux, et les colore avec une grande intensité, et très complètement, c'est-à-dire sur une très grande longueur.

Ils se détachent donc très nettement au sein des éléments non colorés, se laissent facilement distinguer des cellules de soutènement, etc., et se laissent souvent suivre à travers des distances surprenantes. Aucune autre méthode ne permet de suivre aussi loin les prolongements de cellules nerveuses. Mais elle ne permet pas d'embrasser d'un même coup d'œil le détail histologique des autres tissus de la préparation ; et tout détail cytologique est perdu C'est une méthode on ne peut plus *spéciale*. De plus, c'est une méthode qui demande tout autant que les imprégnations ordinaires à l'or ou à l'argent une grande circonspection dans l'interprétation des images obtenues. Un de mes correspondants m'écrit : « J'ai *golgifié* une pomme de terre, et obtenu des *fibres nerveuses* de toute beauté ! »

Il y a *deux méthodes* de Golgi ; la *méthode lente*, très peu employée aujourd'hui ; et la *méthode rapide*, qui est devenue classique. Cette méthode a subi aux mains d'autres travailleurs de nombreuses modifications de détail, dont la plus importante est le procédé d'imprégnation « double » ou « intensive » de Ramòn y Cajal.

On a dit que la méthode de Golgi ne donne pas de bons résultats pour les Invertébrés. Cependant Ramòn y Cajal l'a appliquée avec succès aux muscles des Insectes, etc. ; von Lenhossèk aux nerfs de *Lumbricus ;* et d'autres anatomistes ont également réussi avec certains objets.

647. Méthode lente[1] **de** Golgi. — Pour l'étude des *nerfs périphériques*, Golgi (*Arch. per le scienze med.*, 1879, p. 238) procède ainsi qu'il suit. Des morceaux de nerf sont mis dans une solution de bichromate de potasse à 2 p. 100 pendant quatre, six ou huit heures, ou au plus deux jours. On en transporte par intervalles dans une solution de nitrate d'argent à 0,75 p. 100 où il séjournent de douze à vingt-quatre heures. On les lave avec de l'alcool plusieurs fois renouvelé. On dissocie dans l'alcool, on éclaircit dans l'essence de térébenthine, et on monte dans la résine damar. On réduit à la

[1] Voyez la note du n° 701.

Digitized by Google

lumière directe du soleil ; il faut pour cela en été quelques jours, en hiver quelques semaines. Ces préparations *se conservent indéfiniment*.

Comme nous l'avons dit, cette méthode n'a jamais joui de la faveur que s'est acquise la *méthode rapide*.

648. Méthode rapide[1] **de** Golgi (*ibid.*, p. 237). — On met des morceaux de tissu dans un liquide composé de :

Sol. de bichromate à 2 p. 100	10 parties.
Sol. d'acide osmique à 1 p. 100	2 —

Après une heure, on découpe les pièces en morceaux plus petits qu'on remet dans le liquide. Trois heures plus tard, on commence à transporter les morceaux dans de la solution de nitrate d'argent à 0,5 p. 100, en en transportant un certain nombre toutes les trois heures, de manière à être sûr que dans la masse il y en aura qui auront eu un bain de bichromate de la durée voulue. Cette durée se trouvera en général être comprise entre les limites de six et vingt-quatre heures. On laisse les pièces dans le nitrate d'argent pendant au moins huit heures ; on peut les y laisser indéfiniment. On déshydrate, on éclaircit à l'essence de térébenthine, et on monte au damar. Cette méthode est plus rapide et plus facile que la première de ces méthodes, et les résultats en sont même un peu *plus précis*, mais les préparations *ne se laissent pas conserver* d'une manière permanente, à moins de certaines précautions très spéciales que nous allons détailler, et qui ne réussissent pas toujours.

649. Critique de la méthode de Golgi. — Le procédé de Golgi repose apparemment sur une décomposition double au sein des tissus. Le bichromate se combinerait avec le nitrate et en formerait un précipité brun de bichromate d'argent — $K^2Cr^2O^7 + 2\ AgNO^3 = Ag^2Cr^2O^7 + 2\ KNO^3$ (ce précipité est brun à la lumière réfléchie, mais paraît noir à la lumière transmise). Or, ce précipité ne se laisse pas facilement conserver dans les tissus sans altération chimique ni moléculaire. Les préparations sont donc très difficiles à conserver. A moins de précautions spéciales elles ne résistent pas aux manipulations d'inclusion pour les coupes, ni même aux opérations du montage au baume ; et souvent elles se détériorent après avoir été peu de temps dans ce milieu. La méthode a un autre défaut, c'est que l'imprégnation est très incertaine ; il est souvent difficile, quelquefois impossible d'obtenir la réaction.

[1] Voyez la note du numéro 701.

Digitized by Google

Nous groupons les modifications suivantes du procédé selon qu'elles visent surtout à obtenir de bonnes imprégnations, ou à rendre plus sûre la conservation des préparations.

MODIFICATIONS DU DÉTAIL DE L'IMPRÉGNATION

650. — Mondino (*Arch. per le Sc. med.*, VIII, p. 45; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 547) recommande de laisser les pièces dans le mélange de bichromate et d'osmium plus longtemps que ne le conseille Golgi — de un à huit jours ; et également de les laisser au delà de vingt-quatre heures dans le nitrate d'argent.

651. — Ramòn y Cajal a toujours employé la *méthode rapide*. Nous avons donné, numéro 632, le détail du procédé employé pour les nerfs moteurs des *Insectes*. Pour les temps et les doses des réactifs employés pour l'*écorce cérébrale des Mammifères*, voir *La Cellule*, VII, 1891, p. 129. En général, l'auteur durcissait dans le mélange bichromo-osmique (concentration pas indiquée, mais voyez 652, *Rétine*) durant cinq à huit jours, à une température de 25° C. environ. Il a trouvé avantageux d'employer le procédé à la gélatine de Sehrwald (plus loin) pour éviter les précipités superficiels. Il préfère ne pas employer le traitement de Greppin à l'acide bromhydrique (plus loin), ni celui d'Obregia au chlorure d'or (plus loin), ayant trouvé que, bien que ces procédés contribuent à rendre les préparations plus durables, ils obscurcissent les rapports les plus délicats des fibres.

Pour des *embryons de Poulet*, il emploie la même méthode (*Anat Anz.*, V, 1890, p. 85).

652. Imprégnation « double » ou « intensive » de Ramòn y Cajal. — Dans un travail sur les *ganglions sympathiques* (que je n'ai pas pu consulter, et je cite d'après *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 241), Ramòn y Cajal décrit ce procédé. Après avoir durci pendant trois jours (*embryons de Poulet*) dans le mélange bichromo-osmique (voyez plus bas, *Rétine*, pour les doses), les pièces sont mises pour trente-huit heures dans la solution de nitrate d'argent (0,5 à 0,75 p. 100). On les reporte ensuite dans le mélange bichromo-osmique, soit le même qui a déjà servi, soit un nouveau mélange plus faible, ne contenant que 2 parties de la solution d'acide osmique pour 20 parties de la solution de bichromate. Après traitement par ce mélange (durée pas indiquée), on lave rapidement à l'eau distillée, et l'on remet pour trente-six à quarante-huit heures dans le nitrate d'argent.

Digitized by Google

Il est important de trouver la bonne durée pour la première imprégnation dans le mélange bichromique. Si elle a été trop longue (quatre jours), ou trop courte (un jour), la deuxième imprégnation ne réussira pas. En ce cas, il faut recourir à une troisième imprégnation. Les pièces sont de nouveau traitées par le mélange bichromique faible, et enfin encore une fois par le bain d'argent.

Pour la *rétine* (*La Cellule*, IX, I, 1883, p. 129) le procédé indiqué est le même ; vingt-quatre à quarante-huit heures dans le mélange (*solution de bichromate à* 3 p. 100, 20 *parties ; acide osmique à* 1 p. 100, 5 *ou* 6 *parties*) ; égoutter et mettre pour vingt-quatre heures dans le nitrate d'argent (0,75 à 1 p. 100); remettre dans le mélange osmio-bichromique originel, ou dans le mélange faible comme ci-dessus pour vingt-quatre à trente-six heures ; nouveau bain de nitrate, d'au moins un jour ; alcool, quelques minutes ; enrobage superficiel à la paraffine ; coupes ; damar sans verre à couvrir.

653. Kallius (*Anat. Hefte*, X, 1894, p. 527 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 154) donne pour la *rétine* des doses et des durées pratiquement identiques à celles que nous venons de citer de Ramòn y Cajal (imprégnation double). Il dit cependant avoir souvent employé le bichromate d'ammoniaque ou de sodium au lieu du sel potassique, et pense avoir observé une réaction meilleure. Il faisait agir tous les réactifs à l'obscurité. Les préparations aux sels d'ammoniaque ou de sodium avaient rarement besoin d'une deuxième imprégnation.

654. Oyarzun (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXV, 1890, p. 380) employait pour le *cerveau des Amphibiens* l'imprégnation *simple*, suivant Ramòn y Cajal : vingt-quatre heures dans le bain osmique, et autant dans le bain d'argent, pour des Grenouilles. Pour *Triton* et *Salamandra*, il suffit de vingt heures ; trente et quarante heures seraient trop.

655. Van Gehuchten (*La Cellule*, VII, 1, 1892, p. 87) loue beaucoup l'*imprégnation double* de Ramòn y Cajal. Il met des ganglions sympathiques de petits Mammifères nouveau-nés pour trois jours et à l'obscurité dans le mélange osmio-bichromique de Cajal, lave rapidement à l'eau et met pour deux jours au moins, à l'obscurité, dans le bain d'argent (0,75 p. 100). Nouveau lavage rapide à l'eau, nouveau bain de trois jours dans la solution originelle osmio-bichromique ; nouveau lavage et nouveau bain d'argent pendant au moins deux jours. Puis enrobage rapide à la celloïdine, coupes, alcool, créosote et térébenthine, damar. L'auteur avait cru pendant quelque temps que l'addition de quelques gouttes d'acide formique au bain d'argent favorisait la réduction ; mais des essais comparatifs lui ont montré que la réduction se fait d'une façon tout aussi régulière en employant la solution pure de nitrate d'argent.

Digitized by Google

656. Geberg (*Intern. Monatschr.*, X, 1893, H. 6, p. 205 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 247) a employé (pour l'innervation de la peau de becs de Canards) la méthode rapide, mais pas l'imprégnation double, qui ne lui a pas offert d'avantages. Il fait la première imprégnation à une température de 25° à 30° C. à l'obscurité, et laisse les pièces dans le bain de quatre à sept jours; vingt-quatre à quarante-six heures dans la nitrate d'argent (1 p. 100). De même Fusari (*op. cit.*, p. 252), (parenchyme de la rate).

657. Smirnow (*Intern. Monatschr.*, X, 1893, H. 6, p. 241 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 254) pour l'étude des terminaisons nerveuses dans la peau de l'Homme, fait la première imprégnation dans le mélange d'Altmann (bichromate de potasse à 5 p. 100 et acide osmique à 2 p. 100, parties égales). Les pièces y restent de cinq à dix jours, et après avoir été rincées dans une solution de nitrate d'argent à 0,1 p. 100 sont mises pour dix-huit à quarante-huit heures dans une solution à 1 p. 100 de ce sel.

Pour les terminaisons nerveuses dans l'épithélium du Lombric, le même auteur (*Anat. Anz.*, IX, 1894, p. 571) emploie un mélange de bichromate à 5 p. 100 et acide osmique à 1 p. 100, à parties égales. Il y met des morceaux de l'animal de 1,5 à 2 centimètres de longueur, et les y laisse de cinq à vingt-huit jours. Bain d'argent de vingt-quatre à trente-six heures, alcool à 70 p. 100, coupes, damar.

658. Sala (*Zeit. f. wiss. Zool.*, LII, 1, 1891, p. 18 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 18), dans un travail fait au laboratoire de Golgi, donne la *méthode rapide* comme suit (pour le *pes hippocampi majoris* de petits Mammifères) : Quatre à cinq jours dans du bichromate de potasse à 2 p. 100 ; vingt-quatre à trente heures dans le mélange (solution de bichromate, 8 parties, pour 2 de la solution d'acide osmique) ; bain d'argent à 0,75 p. 100. Le procédé de Greppin à l'acide bromhydrique (plus loin) serait non seulement inutile, mais pernicieux. Le procédé de Sehrwald (plus loin) pour l'inclusion à la paraffine ne serait pas à recommander. Le but de l'inclusion à la paraffine est d'obtenir des coupes très fines. Or la qualité essentielle de la méthode de Golgi est qu'elle permet de suivre des prolongements cellulaires à travers de grands trajets. Évidemment des coupes très minces ne se prêtent pas à cela. Il est plus raisonnable de laver simplement à l'eau les pièces qui sortent du bain d'argent, de les coller sur un liège avec de la gomme arabique, de mettre le tout pour quelques heures dans l'alcool pour durcir la gomme, et de couper au microtome sans autre enrobage.

659. Sacerdotti (*Intern. Monatschr.*, XI, 1894, H. 6, p. 326 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 3, 1894, p. 380) donne, d'après Golgi, le renseignement suivant. Des pièces qui ont séjourné trop longtemps, trois ou quatre semaines ou plus, dans le mélange osmio-bichromique, ne

Digitized by Google

donnent plus la réaction. On l'obtient cependant en les lavant dans une solution mi-saturée d'acétate de cuivre jusqu'à ce qu'elles ne donnent plus de précipité, et en les remettant dans le mélange osmio-bichromique, où elles doivent séjourner cinq à six jours ou plus, et être ensuite remises dans le bain d'argent. Les coupes peuvent être montées sous verre à couvrir dans de l'essence de cèdre épaissie.

660. Böhm, et après lui Oppel, ont modifié la méthode en employant, au lieu de bichromate de potasse, l'un l'acide chromique à 0,5 p. 100, l'autre le chromate neutre de potasse. Ils ont obtenu ainsi des imprégnations de conduits biliaires et de réseaux interlobulaires du foie. Voyez *Anat. Anz.*, V, 1890, p. 143 ; VI, 1891, p. 165 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 2, 1890, p. 222, et VIII, 2, 1891, p. 224.

661. Emploi de la formaline (Strong, Durig). — Voyez numéro 93.

662. Sehrwald (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 456) a donné le renseignement fort utile qui suit. Un inconvénient du procédé de Golgi se trouve dans le fait qu'il se forme très souvent à la surface des pièces des précipités volumineux qui nuisent à la netteté des images. On les évite ainsi. On fait une solution de gélatine à 10 p. 100 dans l'eau. On enrobe les pièces dans cette gélatine dans une boîte de papier à l'aide de la chaleur, et l'on porte le tout dans le bain d'argent. Les précipités se font alors dans la gélatine. Après l'argentage, on éloigne la gélatine au moyen d'eau chaude saturée de bichromate d'argent (plus loin).

MODIFICATIONS CONCERNANT LA CONSERVATION DES PIÈCES

663. Sehrwald (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 443) pense que la détérioration des préparations faites provient de la solution du précipité de bichromate d'argent dans les liquides de préparation ; — dans l'eau, dans des chlorures qui peuvent se trouver dans l'alcool, dans le xylol, dans la paraffine, même dans le baume. Il pense tourner la difficulté en additionnant tous ces réactifs de bichromate d'argent. Cela se fait en y ajoutant le sel en poudre jusqu'à saturation, même à la paraffine et au baume, et en employant la chaleur pour aider à la dissolution.

664. Samassa (*op. cit.*, VII, 2, 1890, p. 26) fait observer qu'il est inexact que le bichromate d'argent soit soluble dans tous ces milieux, et pense qu'en conséquence l'explication de Sehrwald n'est pas la bonne. Il admet plutôt que le précipité se trouve être emporté peu à

Digitized by Google

peu, par parcelles, par la force mécanique des courants de diffusion provoqués lors du passage des pièces à travers les réactifs, et particulièrement par ces courants de longue durée qui sont la conséquence du séchage lent du baume sous un verre à couvrir. Il recommande donc simplement *de monter les coupes sans verre à couvrir.*

665. Fick (*op. cit.*, VII, 2, 1891, p. 168) n'admet pas la théorie des courants de diffusion de Samassa. Il fait observer que le bichromate d'argent est bel et bien soluble dans l'eau, surtout la chaleur y aidant. Et après des expériences minutieuses *ad hoc*, il conclut que c'est l'eau des réactifs ou de l'humidité confinée dans les préparations par le verre à couvrir qui détériore les coupes. Il faut donc éviter autant que possible de traiter les pièces par des *réactifs aqueux;* et il faut *monter les coupes sans verre à couvrir*, comme l'a proposé Samassa; ou bien les monter sur le verre à couvrir lui-même, en ayant soin de ménager un espace libre entre celui-ci et le porte-objet au moyen de supports (de cire, etc.). Ou bien, on peut monter sans verre à couvrir, quitte à en ajouter un plus tard, après qu'on a rendu le baume parfaitement anhydre en chauffant soigneusement à l'étuve.

Cette dernière manœuvre a été également recommandée par Huber (*Anat. Anz.*, VII, 1892, p. 587).

666. Greppin (*Arch. f. Anat. u. Entw.*, 1889, Supp. p. 55 ; *Anat. Anz.*, IX, 3, 1893, p. 75) traite des coupes (préparées par la *méthode lente*) pendant quelques secondes par l'acide bromhydrique (de 2 à 10 p. 100), ce qui les rendrait assez résistantes pour supporter un verre à couvrir. Nous avons déjà dit que Ramòn y Cajal et Sala n'approuvent pas ce procédé.

667. Méthode d'Obregia (*Virchow's Archiv.*, CXXII, 1890, p. 387; *Journ. Roy. Mic. Soc.* 1891, p. 536). — On fait des coupes de matériel argenté, soit à main levée, soit à la paraffine ou à la celloïdine, en ayant soin qu'en aucun cas les tissus ne subissent le contact d'alcool de moins de 94 ou 95 p. 100. On les passe par l'alcool absolu et on les porte dans un mélange de 8 à 10 gouttes de solution de chlorure d'or à 1 p. 100 avec 10 cc. d'alcool absolu. Ce mélange doit être préparé une demi-heure avant de servir, et doit rester exposé à la lumière diffuse du jour jusqu'à ce qu'on y mette les coupes. On met le tout alors à l'abri de la lumière. Les coupes y demeurent de quinze à trente minutes. On les lave rapidement dans l'alcool à 50 p. 100 d'abord, puis dans l'eau, et on les traite pendant cinq à dix minutes par une solution d'hyposulfite de soude à 10 p. 100. Enfin on lave bien à l'eau, et on passe au montage sous verre à couvrir. On peut auparavant, si l'on

Digitized by Google

veut, faire une coloration au carmin ou à l'hématoxyline, ou par le procédé de Pal.

La substitution de l'or à l'argent dans ces préparations avait déjà été tentée sans succès par SEHRWALD (n° 663). Obregia pense que l'insuccès de Sehrwald est dû à ce qu'il avait employé le sel d'or en solution aqueuse.

On peut également appliquer ce procédé d'aurification à du matériel préparé par la méthode au sublimé de GOLGI (plus loin n° 701).

668. Méthode de KALLIUS (*Anat. Hefte*, II, 1892, p. 269 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 4, 1893, p. 477). — On fait une solution avec 230 cc. d'eau distillée et 20 cc. de révélateur photographique à l'hydroquinone, du commerce, (ce révélateur contient 5 grammes d'hydroquinone 40 grammes de sulfite de soude, 75 grammes de carbonate de potasse, et 250 grammes d'eau distillée). Au moment de l'employer on allonge encore cette solution d'un tiers à une moitié d'alcool absolu. On y met les coupes argentées, et on les y laisse quelques minutes ; elles passent à un gris foncé ou noir. Pour savoir à quel moment la réduction est devenue complète, on jette une coupe dans une solution d'hyposulfite de soude (à 1 pour 5 d'eau). Si la réduction est complète, il n'y aura pas de changement ; car l'hyposulfite dissout rapidement le chromate d'argent, mais n'attaque pas l'argent métallique. Aussitôt qu'on a obtenu une réduction complète, on met les coupes pour dix à quinze minutes dans de l'alcool à 70 p. 100, puis pour cinq minutes dans une solution d'hyposulfite de soude et de là dans une quantité considérable d'eau distillée, dans laquelle elles doivent rester pendant vingt-quatre heures et plus. On déshydrate et on monte sous verre à couvrir. On peut pratiquer des colorations au carmin, etc., si l'on veut.

KALLIUS a essayé d'autres révélateurs. Ils ont donné de bonnes réductions, mais ils produisaient une coloration diffuse rouge ou brune des tissus qui ne se laissait pas facilement éloigner.

AUTRES MÉTHODES

669. ALT (*Münch. med. Wochenschr.*, 1892, n° 4 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 81) colore pendant deux heures dans une solution de rouge Congo dans l'alcool absolu, et déshydrate dans l'alcool pur. Coloration cylindraxile, applicable à des nerfs périphériques et aussi aux centres nerveux.

670. Méthode au palladium de PALADINO (*Rendic. R. Accad. Sci.*

Digitized by Google

Napoli, IV, 1890, p. 14, et 1891 (1892), p. 227 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 817, et 1892, p. 439 ; *Arch. Ital. de Biol.*, XVII). — Des portions de matériel durci au bichromate, à l'acide chromique, ou au sublimé, et n'ayant pas plus de 5 à 8 millimètres d'épaisseur sont mises pour deux jours dans une grande quantité de solution de chlorure de palladium à 0, 1 p. 100. Il faut au moins 150 à 200 cc. pour chaque portion du tissu. (Pour la manière de faire la solution, voyez n° 72.) Après cela on les met dans une solution d'iodure de potassium. Le premier des mémoires cités dit que cette solution doit être à 1 p. 100 et que les pièces doivent y rester vingt-quatre heures. Le deuxième dit qu'elle doit être de 4 p. 100, qu'on doit n'en prendre que de petites quantités, et que de petites pièces ne doivent pas y rester plus d'une heure ou deux. Déshydrater ; coupes à la paraffine, baume.

Coloration brune, à la fois cylindraxile et myélinique, et applicable à la fois aux centres nerveux et aux organes périphériques.

671. Méthode au chlorure de vanadium de Wolters (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 471). — On prend du matériel (système nerveux central ou périphérique) qui a été durci par le procédé de Kultschitzky (n° 55), et l'on fait des coupes à la paraffine ou à la celloïdine. Les coupes sont mordancées pendant vingt-quatre heures dans un mélange de 2 parties de solution de chlorure de vanadium à 10 p. 100 et 3 parties de solution d'acétate d'aluminium a 3 p. 100. On les lave pendant dix minutes à l'eau, et on colore pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 40° C. dans une solution de 2 grammes d'hématoxyline (dissoute dans un peu d'alcool) dans 100 cc. d'acide acétique à 2 p. 100. On les lave dans de l'alcool à 80 p. 100 contenant 0. 5 p. 100 d'acide chlorhydrique, jusqu'à ce qu'elles aient viré à un rouge clair bleuâtre. On lave bien à l'alcool pour éloigner l'acide, on éclaircit à l'essence d'origan et on monte. Coloration cylindraxile, mais qui teint aussi toute sorte de cellules qui peuvent se trouver dans la préparation.

672. Méthode de Marchi pour *Nerfs dégénérés* (*Rivista sperim. de Fren. e di Med. legale*, 1887, p. 208 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 350, et X, 4, 1893, p. 506 note). — Les nerfs sont durcis pendant une semaine dans le liquide de Müller et mis pour quelques jours dans un mélange de deux parties de liquide de Müller avec une partie d'acide osmique à 1 p. 100. Le traitement préalable par le sel chromique a pour effet de priver la myéline des tubes nerveux

Digitized by Google

normaux de la faculté de s'imprégner d'osmium, tandis que la myéline pathologique, chargée de produits de dégénérescence, s'en imprègne. En conséquence on a les gaines myéliniques des nerfs sains colorées en jaune, celles des trajets dégénérés en noir.

STRUCTURE INTIME DES NERFS

673. Tubes nerveux à myéline. — On peut acquérir des notions générales sur la structure de ces éléments par les méthodes ordinaires. On étudiera des coupes microtomiques longitudinales et transversales de nerfs colorés par différentes teintures ; on dissociera des nerfs frais dans l'humeur aqueuse, le sérum iodé, etc. Pour mettre en évidence le cylindre-axe et la gaine de Schwann, on enlévera la myéline par des méthodes appropriées : — on peut faire bouillir dans la soude caustique et neutraliser ensuite ; — faire bouillir dans un mélange d'alcool absolu et d'éther, et ajouter de la soude caustique ; — faire bouillir dans l'acide acétique cristallisable ; — faire bouillir dans l'acide nitrique fumant et ajouter de la potasse caustique ; — ou enfin traiter par l'eau de Javelle.

Méthode de Kuhnt (*Arch. f. mik. Anat.*, 1876. p. 441). — On met un nerf pendant vingt-quatre heures dans de l'acide osmique à 0,25 p. 100, on lave à l'eau et on met pendant vingt-quatre heures dans un mélange de 10 cc. d'eau et 10 à 30 grammes d'ammoniaque caustique. On dissocie dans l'eau.

Méthode de Tizzoni (*Arch. per le Scienze mediche*, 1878, p. 4). — On durcit un nerf pendant plusieurs jours dans l'alcool, en commençant par l'alcool à 36° B. et en finissant par l'alcool absolu. Ensuite on fait bouillir pendant une ou deux heures dans une quantité considérable de chloroforme (l'éther ou la benzine peuvent servir, mais moins bien) ; il faut renouveler le chloroforme deux ou trois fois. On examine au microscope de temps à autre pour voir si la dissolution de la myéline est complète. On conserve ensuite les pièces dans l'alcool jusqu'au moment de s'en servir. Colorer à l'hématoxyline ou au picrocarmin. L'hématoxyline colore le cylindre-axe et les noyaux des tubes ; le picrocarmin colore d'une manière intense les noyaux, le cylindre-axe à peine, et teinte légèrement en jaune le « réticulum corné ».

674. Tubes nerveux à myéline (Ranvier, *Traité*, p. 718 et suiv.). — Nous avons donné numéro 14 la méthode de Ranvier pour maintenir les nerfs à leur degré naturel d'extension physiologique

Digitized by Google

pendant la fixation. GOLGI est d'avis que cette méthode ne doit pas être employée pour l'étude de la charpente en entonnoirs découverte par REZZONICO dans la gaine de myéline (*Arch. per le scienze mediche*, 1879, p. 237).

Pour la manière dont RANVIER emploie le nitrate d'argent, voyez son *Traité*, p. 725.

675. Cylindre de l'axe (KUPFFER, *Sitzb. math. phys. Kl. k. bayr. Acad. d. Wiss.*, 1884, p. 446; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 100). — On étale un nerf sur un liège et on le traite pendant deux heures avec de l'acide osmique à 0,5 p. 100; on lave à l'eau pendant deux heures; on colore pendant vingt-quatre à vingt-huit heures dans une solution saturée de fuchsine acide (« Säurefuchsine ») dans l'eau; on décolore pendant six à douze heures (pas plus, en tout cas) dans l'alcool absolu ; on éclaircit dans l'essence de girofle ; et l'on fait l'inclusion dans la paraffine. Dans les coupes on constate que le cylindre de l'axe est un paquet de fibrilles flottant dans un liquide albumineux ; les fibrilles paraissent dans les coupes transversales comme des points rouges. On peut démontrer ces fibrilles par l'osmium seul, mais moins bien (acide osmique, 1 p. 100, vingt à vingt-quatre heures).

676. Autres Méthodes. — Outre les méthodes déjà citées et outre celles exposées en détail par RANVIER dans son *Traité*, voir HUBER, *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 394 (procédé à la Safranine et Lichtgrün de BENDA); GALLI, *ibid.*, III, 1. 1886, p. 467 (coloration au bleu de Chine); PLATNER, *ibid.*, VI, 2, 1889, p. 186 (coloration à l'Echtgrün, Vert solide); RABL, *ibid.*, XI, 1, 1894, p. 42 (les lignes de Fromann sont des productions artificielles dues au nitrate d'argent); FISCHEL, *ibid.*, p. 48 (conclusion semblable); TIRELLI, *ibid.*, XI, 3, 1894, p. 391 ; *Mon. Zool. Ital.*, V, 1894, p. 77 ; GEDOELST, *La Cellule*, III, 1887, p. 117 et V, 1889, p. 126 (bonne description de méthodes de digestion) ; SEGALL, *Journ. de l'Anat. et de la Phys.*, XXIX, 1893, p. 586 ; JAKIMOVITCH, *ibid.*, XXIII, 1888, p. 142 (argentage de cylindres-axes) ; BOVERI, *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 1, 1887, p. 91 ; SCHIEFFERDECKER, dans BEHRENS, KOSSEL, *und* SCHIEFFERDECKER, *Das Mikroskop.*, II, p. 227.

Digitized by Google

CHAPITRE XXX

CENTRES NERVEUX. DURCISSEMENT ET COUPES

677. Introduction. — La technique de l'anatomie microscopique des Centres nerveux est une technique des plus spéciales. Les méthodes ordinaires de l'Anatomie microscopique suffisent bien — du moins tant qu'il ne s'agit que de petits objets — à donner des notions superficielles des formes et des rapports des principaux groupes d'éléments nerveux. Mais elles ne suffisent absolument pas à nous renseigner sur la structure si délicate et si compliquée de ces éléments eux-mêmes, ni sur les rapports qu'ils affectent entre eux. Ces problèmes ne se laissent attaquer qu'à l'aide de procédés fort spéciaux, surtout sous le rapport des colorations si spécialement électives qu'il est nécessaire de réaliser.

L'encéphale si volumineux des animaux supérieurs, et surtout de l'Homme, demande en outre des précautions spéciales pour le durcissement, pour la manipulation des coupes, et pour la coloration.

Par suite de la lenteur de pénétration des réactifs, il faut évidemment renoncer le plus souvent à la fixation des éléments de l'*organe entier* dans le sens histologique ; on ne saurait espérer conserver que l'état *post mortem ;* c'est pourquoi nous commençons par les procédés de durcissement.

A consulter, outre les travaux cités dans les paragraphes qui vont suivre — BEVAN LEWIS, *The Human Brain; Histological and Coarse Methods of Research*, London, Churchill ; — DEJERINE, *Anatomie des centres nerveux*, Paris, Rueff ; — MERCIER, *Les Coupes du système nerveux central*, Paris, Rueff.

DURCISSEMENT

678. Durcissement par congélation. — La méthode de la congélation est très admissible ici et peut surtout rendre des services pour l'étude histologique de l'écorce. Pour une description détaillée des manipulation

Digitized by Google

de la congélation et des coupes, nous renvoyons au traité consciencieux précité de BEVAN LEWIS. — Nous dirons seulement deux mots de la méthode de congélation à employer. S'il s'agit d'un organe qui a été déjà durci par les procédés connus, on pourra employer la méthode de congélation par le mélange de glace et de sel de cuisine ; mais en ce cas il faut avoir soin d'infiltrer préalablement le tissu par une masse mucilagineuse ou gélatineuse (nos 309, 310), sous peine de voir se former dans les tissus des aiguilles de glace qui rendront impossible l'obtention de belles coupes. Mais s'il s'agit d'un organe frais, c'est la méthode de congélation par un vaporisateur à l'éther qu'il convient de prendre. Cette méthode, qui permet de créer rapidement et de maintenir ou de faire cesser à volonté tous les degrés d'intensité de congélation, permet de se dispenser de l'emploi de masses d'infiltration ayant pour but de prévenir la formation de cristaux de glace ; c'est la seule méthode qui permette d'obtenir des coupes un peu satisfaisantes de tissu nerveux non durci. On fait flotter les coupes sur l'eau, on les traite (LEWIS) pendant une minute sur le porte-objet par l'acide osmique à 0,25 p. 100, on lave pendant cinq minutes à l'eau, et l'on colore.

679. Durcissement par les réactifs. — Avant d'exposer un organe nerveux ou une portion d'un tel organe à l'action d'un réactif durcissant, il convient de prendre les précautions nécessaires pour que les pièces ne se déforment pas. Si l'on ne soumet au durcissement que des portions relativement petites de tissu nerveux, le mode opératoire est très simple. On peut découper une moelle ou une région quelconque de l'encéphale en tranches de quelques millimètres d'épaisseur, les poser sur de la ouate, et les transporter avec la ouate dans un récipient dans lequel on verse ensuite le liquide durcissant. La ouate remplit deux fonctions : elle forme un coussin élastique sur lequel les pièces peuvent reposer sans se déformer par leur propre poids ; et elle leur permet d'être en contact avec le réactif par leurs faces inférieures aussi complètement que par leurs autres faces, ce qui est important au point de vue de la rapidité de pénétration du réactif et de l'égalité du durcissement obtenu. Il est bon de suspendre les pièces, toujours enveloppées de ouate, dans le récipient ; si l'on fait usage d'un récipient en forme de cylindre, et que l'on suspende les pièces vers le haut du cylindre, on activera notablement les processus de diffusion et la pénétration du réactif. En tous cas, si l'on pose des pièces à plat sur le fond du récipient, il ne faut jamais les poser les unes sur les autres.

S'agit-il de pièces volumineuses qu'on désire cependant ne pas diviser en portions, on fera autant que possible des incisions plus ou moins profondes dans les endroits les moins importants à sauvegarder ; nous recommandons de ne pas enlever les membranes, si ce n'est la dure-mère ; elles servent utilement à donner du support à la

Digitized by Google

préparation. On pourra enlever en partie la pie-mère et l'arachnoïde après que le durcissement aura fait quelque progrès.

On peut durcir en totalité la moelle épinière, la moelle allongée et le pont de Varole. On enlève la dure-mère, et l'on suspend la pièce dans un vase cylindrique. On attache un petit poids à la partie inférieure de la préparation, dans le double but d'empêcher qu'aucune partie de la préparation ne vienne à nager au-dessus de la surface du liquide (ce qui arrive facilement avec l'emploi de liquides un peu denses, comme le liquide de Müller), et d'empêcher les torsions des tissus qui peuvent, sans cette précaution, être produites par les fibres élastiques de la pie-mère et de l'arachnoïde.

Le cerveau doit être très délicatement posé sur une couche de ouate, ou, si cela est possible, suspendu dans une enveloppe de ouate. On mettra des tampons de ouate dans la scissure de Sylvius, et entre l'operculum et le lobe médian, et, autant que possible, entre les circonvolutions. Cette précaution est indiquée dans l'intérêt de la pénétration du liquide durcissant. Autant qu'il ne s'y oppose pas de raisons majeures, on divisera préalablement le cerveau en deux moitiés symétriques par une incision sagittale passant par le plan médian du corps calleux. Betz conseille d'enlever, après quelques heures de durcissement, la pie-mère partout où elle est accessible, et également les plexus choroïdiens. Nous avons trouvé cette opération un peu délicate, et nous ne la recommandons qu'à des mains expérimentées.

Le cervelet se traite d'après les mêmes principes.

Weigert (*Centralbl. f. d. med. wiss.*, 1882, p. 819 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 388) a trouvé que le durcissement des centres nerveux par le liquide de Müller ou par celui d'Erlicki est activé si l'on maintient les préparations dans un incubateur à une température de 30 à 40° C. A cette température, le liquide de Müller peut durcir en huit à dix jours, le liquide d'Erlicki en quatre jours, tandis qu'à la température normale il en faudrait deux ou trois fois autant.

Notons ici que Sahli, qui a étudié en détail l'action des sels chromiques, est d'avis que le procédé du durcissement à l'incubateur est beaucoup moins sûr que le durcissement lent, et devrait être abandonné. (Voyez *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 3.) Se décide-t-on pour le durcissement lent, il est bon de tenir le matériel très au frais ; en été, on le mettra à la cave, ou mieux dans une glacière.

680. Fixation par injection. — Chez les animaux inférieurs il est possible d'introduire des liquides fixateurs et durcissants au sein des centres nerveux par injection, ce qui procure une pénétration des organes incom-

Digitized by Google

parablement plus rapide que celle qu'on obtient par la simple immersion dans les réactifs. De Quervain (*Virchow's Arch.*, CXXXIII, 1893, II. 3, p. 481; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 4, 1893, p. 507) a réussi avec des Chiens et des Chats. Le sujet, légèrement chloroformé, est fixé sur la table à opérations. On met à nu une carotide, on la coupe et on fixe dans la portion centrale aussi bien que dans la portion périphérique une canule à robinet. On ouvre d'abord le robinet de la portion centrale, et on laisse s'écouler le sang jusqu'à ce qu'il n'en vienne plus. Ensuite on injecte par la canule périphérique (donc vers le cerveau) du liquide de Müller, à la température du corps, et sous une pression modérée. On injecte encore alternativement par la canule centrale et la canule périphérique une quantité de liquide de Müller égale à la quantité de sang écoulé : pour des Chiens il faut de 300 à 600 cc., pour des Chats un tiers ou la moitié de cette dose. L'injection faite, on pose des ligatures, on enlève l'encéphale, et on le met pour quelques semaines dans du liquide de Müller tenu à 37° C.

Mann (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 482) procède d'une manière semblable. Il pratique l'injection par l'aorte ascendante. Avant de pousser l'injection fixatrice, il injecte pendant une vingtaine de secondes de la solution physiologique de sel, chauffée à 39° C. Ceci a pour but de laver les capillaires du cerveau, de sorte que le sang ne puisse pas s'y coaguler. Le fixateur dont se sert Mann est une solution saturée de sublimé, chauffée à 39° C. Au bout de cinq minutes d'injection, le cerveau doit se trouver entièrement fixé. On le sort, et on le met pour douze heures dans de la solution de sublimé, après quoi on le conserve dans du sublimé faible, 0,1 p. 100, ou bien on passe par les alcools usuels à l'inclusion dans la paraffine.

681. Les réactifs durcissants à employer. — Les durcissants les plus importants sont les sels chromiques. Vu la lenteur avec laquelle ces sels pénètrent, il est souvent recommandable de traiter les pièces en premier lieu pendant vingt-quatre heures ou plus par l'alcool de 80° à 90°, pour empêcher la macération des parties éloignées de la surface. On s'est beaucoup servi dans le temps d'acide chromique, mais la plupart des travailleurs sont d'accord pour admettre que son action, quoique bien plus rapide que celle des sels chromiques, est plus inégale et donne souvent lieu à une friabilité désastreuse des tissus. L'acide osmique est excellent — selon Bevan Lewis, de beaucoup le meilleur des durcissants ; — mais malheureusement son emploi est borné à des pièces très petites ; on ne saurait guère l'employer avec des objets de plus de 1 centimètre cube de volume.

La grande majorité des travailleurs sont d'accord pour admettre que c'est le *bichromate de potasse* qui donne en général les meilleurs résultats. Les opinions ne sont guère partagées que sur le point de savoir si ce sel doit être employé pur ou en combinaison avec d'autres sels. Nous avons déjà noté que le liquide d'Erlicki exerce une action durcissante plus rapide que les autres solutions de sels chromiques ; pour ce motif c'est un des réactifs les plus employés. Sahli cependant

Digitized by Google

(*l. c.* n° 679) après une étude spéciale de cette question, a conclu que le meilleur des durcissants pour du matériel frais est le bichromate pur à 3 ou 4 p. 100, agissant à une basse température. Il n'approuve pas l'addition de sulfate de soude (liquide de Müller), et rejette le liquide d'Erlicki à cause des précipités auxquels il donne si souvent lieu. OBERSTEINER est du même avis.

Deux observateurs récents, FISH (*The Wilder Quarter-Century Book*, 1893, p. 385), et DONALDSON (*Journ. of Morphol.*, IX, 1894, p. 123 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1894, p. 642) ont fait de nombreuses pesées et déterminations de volume pour contrôler les changements produits dans des encéphales de Mouton par les réactifs durcissants. Ils ont trouvé que, alors que tous les autres réactifs provoquent une diminution de poids et de volume, les solutions de bichromate produisent une légère augmentation et de poids et de volume.

La formaline est un réactif qui est trop récemment a l'étude pour qu'il soit possible d'avoir une opinion définitive à son sujet. Voyez numéro 93.

Relativement à la question de savoir jusqu'à quel point certaines altérations soi-disant pathologiques des cellules glanglionnaires doivent être attribuées à la putréfaction ou à l'influence des réactifs, voyez le *Neurologisches Centralblatt*, des années 1884 et 1885.

Pour les taches « pigmentaires » produites par le liquide d'Erlicki, voyez le numéro 57.

682. Doses des réactifs durcissants. — Il faut se souvenir que, excepté pour le cas de l'osmium, il faut toujours *commencer* le durcissement en employant le réactif à la dose la plus faible qui est compatible avec la bonne conservation des tissus ; on *changera fréquemment* le liquide durcissant et on en augmentera à mesure la concentration.

Le *bichromate de potasse* s'emploie au début à une concentration, en général, de 2 p. 100 ; on passe ensuite à des solutions plus concentrées, jusqu'à 3 ou 4 p. 100 pour la moelle et pour le cerveau, et jusqu'à 5 p. 100 pour le cervelet.

Le *bichromate d'ammoniaque* se prend de moitié plus faible, et même encore plus dilué (jusqu'à 0,5 p. 100), du moins au début; on peut aller jusqu'à 5 p. 100 à la fin du durcissement, pour le cervelet.

L'*acide chromique* ne s'emploie guère plus, si ce n'est en combinaison avec un autre réactif; nous donnons plus bas les formules de quelques mélanges de ce genre. On peut ajouter aux solutions des

Digitized by Google

sels chromiques une faible proportion d'acide chromique, par exemple 3 à 6 gouttes d'une solution à 1 p. 100 pour 100 cc. de la solution de sel. Cela active un peu le durcissement et ne fait pas de mal.

L'*acide osmique* s'emploie à 1 p. 100; à cette dose il durcit convenablement de petits fragments de tissu nerveux en cinq à dix jours (EXNER).

L'*acide nitrique* a été employé à des doses de 10 à 12 p. 100. A cette dose il fournit des préparations ayant beaucoup de consistance; nous ne savons si la conservation histologique est bonne.

A. KOTLAREWSKY (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 3, 1887, p. 387) a trouvé que l'acétate neutre de plomb à 10 p. 100 conserve très bien les cellules ganglionnaires.

TRZEBINSKI (*Virchow's Arch.*, 1887, p. 1; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 4, 1887, p. 497), puis DIOMIDOFF, GAULE, OGATA, BECHTEREFF (*ibid.*, p. 499) ont eu de bons résultats avec du sublimé à 7 p. 100 (cinq à neuf jours, pas plus, et naturellement de petites pièces).

Les paragraphes suivants donnent des exemples de ces procédés.

683. Moelle épinière (CIAGLINSKI, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 1, 1891, p. 19). — Solution de Müller, à renouveler tous les jours pendant la première semaine, et après cela aussi souvent qu'elle se trouble. Il faut trois ou quatre mois. Avec le liquide d'Erlicki on arrive au but en autant de semaines. Si l'on emploie ce réactif, il ne faut pas y laisser les pièces plus longtemps, sous peine de les voir se détériorer par la formation des précipités dont nous avons parlé (n° 57).

684. Méthode de BETZ (BETZ, *Arch. f. mik. Anat.*, 1873, p. 101). — On met la *moelle épinière*, la *moelle allongée* et le *pont de Varole* (après avoir enlevé la dure-mère) dans un vase cylindrique avec de l'alcool à 75° ou 80° auquel on a ajouté de l'iode en quantité suffisante pour produire une coloration brun clair. Après deux ou trois jours on enlève la pie-mère et l'arachnoïde. A mesure que l'alcool se décolore, on ajoute de nouvelles quantités d'iode. Si l'on a réussi à bien enlever les membranes, on verra qu'au bout de six jours la préparation n'absorbe plus d'iode, et le durcissement préliminaire est terminé. On porte alors la préparation dans du bichromate de potasse à 3 p. 100, en ayant soin de la suspendre et de la munir en bas d'un petit poids pour l'empêcher de surnager; on met le tout *dans un lieu frais*. Aussitôt qu'on voit paraître un trouble brunâtre dans le liquide et un dépôt brun à la surface de la préparation, le durcissement est achevé. On lave bien à l'eau et l'on conserve les pièces dans une solution de bichromate de 0,5 à 1 p. 100.

Le *cervelet* se traite de même. Il faut enlever les membranes aussi

Digitized by Google

complètement que possible avant de les placer dans l'iode; si cette opération présente beaucoup de difficulté, on laisse macérer la préparation dans l'alcool iodé qui a déjà servi au durcissement et qu'on diluera avant de s'en servir. Au bout de dix à dix-sept jours de traitement par l'iode, l'organe doit être suffisamment durci pour ne pas plier quand on le soulève sur un doigt placé sous l'éminence vermiforme. On complète le durcissement par le bichromate à 5 p. 100.

Le *cerveau*, fendu dans le sens du plan sagittal médian du corps calleux, et débarrassé de ses membranes autant que faire se peut, est placé dans la même solution d'iode, dans un lieu frais. On aura soin d'ajouter de l'iode aussitôt que le liquide se décolore. Après vingt-quatre à quarante-huit heures, on achève de dépouiller l'organe de la pie-mère, et vers la même époque, ou un jour plus tard, on le porte dans une nouvelle quantité de solution d'iode dans l'alcool à 70°, où on le laisse jusqu'à ce que les hémisphères aient acquis une dureté telle qu'ils se laissent soulever sur deux doigts sans plier. On achève le durcissement par le bichromate à 4 p. 100. S'il se montre dans le liquide un dépôt brun excessif avant que l'organe ait acquis la consistance voulue, il faut le laver à l'eau et changer la solution de bichromate. Un hémisphère bien durci doit montrer une coloration brun jaunâtre d'égale intensité sur toute l'étendue d'une section faite à travers toute son épaisseur.

Pour des cerveaux qui ne sont pas frais, il faut prendre un alcool plus fort et accorder plus de temps au durcissement.

Le procédé de Betz est particulièrement indiqué pour des pièces volumineuses, et pour celles qui se trouvent dans un état de ramollissement *post mortem*.

685. Cerveau (Bevan Lewis, *The Human Brain*, p. 102). — Alcool, 90 p. 100, vingt-quatre heures; liquide de Müller, trois jours; après six jours, renouveler le liquide, ou bien substituer (ce qui vaut mieux) une solution de bichromate de potasse à 2 p. 100; après une semaine de traitement par cette solution, on passe à une solution de 4 p. 100; si au bout d'une semaine de séjour dans cette solution, la préparation n'est pas encore de la consistance voulue, on achève le durcissement par l'acide chromique (la concentration n'est pas indiquée).

686. Cerveau (Hamilton, *Journ. of Anat. and Physiol.*, 1878, p. 254). — Le cerveau doit être divisé en tranches de 1 pouce d'épaisseur, ou bien avoir sa surface incisée en de nombreux endroits. Il

Digitized by Google

vaut mieux ne pas enlever les membranes. Mettre les pièces, supportées par de la ouate, comme nous l'avons dit au numéro 679, dans le mélange suivant :

Liquide de Müller	3 parties.
Alcool ordinaire.	1 —

Il se produit de la chaleur lorsqu'on mêle ces deux liquides ; on laisse refroidir le mélange avant de s'en servir. On met le tout dans une glacière. Après vingt-quatre heures, on retourne les pièces. Après quinze jours à trois semaines, on fait une incision dans une partie de la préparation, et, si l'on constate que le liquide n'a pas pénétré à l'intérieur, on renouvelle le liquide. Si au contraire on trouve que la pénétration est suffisante, on met la préparation dans une solution de bichromate d'ammoniaque à 0, 25 p. 100. Après une semaine, on la met dans une solution de bichromate à 1 p. 100 ; et après encore une semaine dans une solution à 2 p. 100, où on la laisse une semaine, ou plus longtemps si cela est nécessaire. Le durcissement achevé, on conserve les pièces, jusqu'au moment de les mettre en coupes, dans une solution d'hydrate de chloral à 2,5 p. 100. (Nous pensons que l'hydrate de chloral rend ici le service d'atténuer la coloration jaune produite par les liquides chromiques.)

687. Encéphale entier (Duval, *Journ. de l'Anat.*, 1876, p. 497). — Bichromate de potasse de 2,5 p. 100, à renouveler au bout de vingt-quatre heures, et encore au bout de trois ou quatre jours. Après deux à trois semaines, acide chromique à 3 p. 100. Il faut changer l'acide tous les jours pendant huit jours, et après ce temps tous les huit jours, jusqu'au milieu du second mois ; après quoi il n'est plus nécessaire de le changer du tout. Il faut que les pièces restent au moins deux mois dans l'acide chromique ; plus elles y resteront longtemps et meilleurs seront les résultats. On doit ajouter au liquide quelques morceaux de camphre pour prévenir le développement de moisissures.

Autre procédé de Duval, plus rapide, mais moins délicat, *loc. cit.*

688. Méthode de Deecke (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1883, p. 449). — Deecke met un cerveau entier dans du bichromate d'ammoniaque de 0,5 p. 100, selon la consistance du cerveau. Quand le cerveau est ce qui s'appelle tendre, il ajoute à la solution 1/6 à 1/10 d'acide chromique et toujours un sixième à un quart de volume d'alcool. (Nous avouons que nous ne sommes pas sûr d'avoir bien compris ces

Digitized by Google

instructions.) — Il met le tout dans une glacière, et renouvelle le liquide souvent. Au bout d'un mois il commence à ajouter de l'alcool, et en ajoute un peu toutes les semaines jusqu'à ce que le liquide contienne 90 p. 100 d'alcool. Puis il met la préparation dans l'alcool pur à 90° qu'il renouvelle aussi longtemps qu'il se colore. Il faut de douze à dix-huit *mois* pour mener ce traitement à bonne fin.

689. Ecorce du cervelet du Chien (BERKLEY, *John Hopkins Hospital Reports*, 1893, p. 195 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 388). — Mélange de FLEMMING, vingt-quatre à trente-six heures ; alcool absolu ; celloïdine ; safranine, ou la modification de la méthode de WEIGERT proposée par BERKLEY.

690. Centres nerveux de Reptiles et de Batraciens (MASON, *Central Nervous System of certain Reptiles*, etc., 1879-1882 ; WHITMAN'S, *Methods*, p. 196). — Alcool iodé, six à douze heures ; solution de bichromate de potasse à 3 p. 100 (avec un morceau de camphre dans le flacon), renouvelée toutes les deux semaines jusqu'à durcissement suffisant (six à dix semaines).

691. BURCKHARDT (*Das Centralnervensystem von Protopterus*, Berlin, 1892 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 347) recommande un liquide composé d'acide chromique à 1 p. 100, 300 parties; acide osmique à 2 p. 100, 10 parties ; et acide nitrique concentré, 10 parties. Les cerveaux s'y durcissent en vingt-quatre à quarante-huit heures.

FISH (*Journ. of Morph.*, X, 1, 1895, p. 234) a employé pour l'encéphale de *Desmognathus fusca* un mélange de 100 cc. d'alcool à 50 p. 100, 5 cc. d'acide acétique cristallisable, 5 grammes de sublimé et 1 gramme d'acide picrique. Fixer pendant douze à vingt-quatre heures, et passer par les alcools usuels.

INCLUSIONS

692. Méthodes d'inclusion. — La paraffine ne peut servir que pour des organes ou portions d'organes nerveux très petits. La moelle de l'Homme peut être infiltrée de paraffine si l'on prend la précaution de n'employer pour l'inclusion que des tranches de peu de millimètres d'épaisseur. Pour les objets intermédiaires — ceux dont la grosseur varie de celle d'une noisette à celle d'une noix — comment doit-on procéder ? Selon nous, il n'y a pas d'hésitation possible : ces objets doivent être mis en coupes par la méthode du collodion ; c'est la méthode la plus sûre, la plus commode et celle qui offre le plus d'avantages pour le traitement ultérieur des coupes. Les objets très gros — hémisphères entiers du cerveau humain — ne se

Digitized by Google

laissent pénétrer par aucune masse d'inclusion jusqu'ici connue ; on ne peut donc pratiquer que l'enrobage simple, procédé qui rend ici de grands services.

Hamilton (*loc. cit.*) recommande la masse à congélation que nous avons indiquée au numéro 309.

Bevan Lewis (*The Human Brain*, p. 86) préfère la méthode de congélation par l'éther pour le cerveau frais. Pour les cerveaux durcis il recommande (p. 108) un mélange de cire blanche et huile d'olive à raison de 1 : 1 ou plus, jusqu'à 3 : 1 ; puis un mélange de cire blanche et de beurre de cacao ; et un mélange de 5 parties de paraffine avec 1 partie d'axonge.

Deecke (*loc. cit.*) place les hémisphères entiers du cerveau humain sur le piston d'un microtome modèle Ranvier, et les y cale avec des morceaux de liège tendre. Ensuite il enrobe le tout dans un mélange de paraffine, huile d'olive et axonge. Il laisse durcir la masse, et l'assujettit en position à l'aide d'un certain nombre de petites tiges courbées qui sont fixées dans le piston qu'elles débordent d'un pouce en hauteur. A mesure qu'on fait les coupes, on éloigne la masse sur une faible profondeur tout autour de la préparation avec des ciseaux, de sorte que le rasoir n'est jamais mis en contact avec autre chose que le tissu nerveux. On coupe sous l'alcool, le microtome étant submergé, dans une cuvette de cuivre. A mesure que les coupes sont faites, on les fait flotter sur des feuilles de papier glacé ; c'est sur ces feuilles qu'on les porte dans le liquide colorant et dans les alcools successifs.

Il faut observer que, pour faire des coupes aussi volumineuses que celles dont nous parlons, le couteau doit être manié avec un mouvement de scie. Il est important de ne pas enlever la pie-mère.

Digitized by Google

CHAPITRE XXXI

CENTRES NERVEUX. COLORATION

A. — COLORATIONS GÉNÉRALES[1]

693. — Pour les colorations générales, c'est-à-dire celles qui ont pour but de démontrer autant que possible la *totalité des éléments* de la préparation, nous avons :

Le carmin à l'ammoniaque. — On pourra prendre la formule qu'on voudra ; le secret du succès, c'est de colorer très lentement dans une solution extrêmement diluée. Les pièces au bichromate doivent y être portées directement, sans passer par l'alcool. Le carmin à l'ammoniaque démontre bien les cellules ganglionnaires et leurs prolongements (nous pensons que sous ce rapport il est bien plus efficace que le carmin au borax), puis les cellules du tissu conjonctif et les vaisseaux.

Le picro-carmin. — Il a à peu près la même action que le carmin à l'ammoniaque, mais il démontre encore mieux les éléments non nerveux.

Le *carmin au borax* ne sera guère utile que si on l'emploie en coloration double avec un autre réactif, par exemple le carmin d'indigo ou le bleu d'aniline. Voyez MAX FLESCH (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 566, et 1885, p. 349), et DUVAL (*Journ. de l'Anat.*, 1875), et nos numéros 233 à 235.

REHM (*Münch. med. Wochenschr.*, 1892, n° 13 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 389) décrit une coloration au carmin ammoniacal suivi de bleu de méthylène.

694. — Le « *blue-black* ») fut recommandé en premier lieu par

[1] Cette classification ne doit pas être prise au pied de la lettre. Il n'est pas possible d'établir une ligne de démarcation absolue entre les colorations générales et les colorations spécifiques.

Digitized by Google

SANKEY (*Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1876, p. 69). Il employait une solution de 0,5 à 1 p. 100, et, pour obtenir une coloration élective, décolorait pendant vingt à trente minutes dans une solution d'hydrate de chloral. BEVAN LEWIS (*The human brain*, p. 125) préconise ce réactif comme étant le plus précieux des colorants pour les centres nerveux. Il colore les coupes dans une solution *aqueuse* à 0,25 p. 100 pendant une heure, et passe par l'alcool et l'essence de girofle, s'il s'agit de coupes du cerveau ou de la moelle ; pour la couche corticale du cervelet, il décolore les coupes pendant vingt à trente minutes dans une solution de chloral à 2 p. 100, puis les traite par un mélange à parties égales d'essence de girofle et d'une solution de chloral à 2 p. 100 auquel on a ajouté assez d'alcool pour avoir une solution claire. Il lave ensuite à l'alcool pur et passe à l'essence de girofle. SANKEY et STIRLING employaient aussi une solution *alcoolique* d' « aniline blue-black » à 0,05 ou 0,1 p. 100, que LEWIS ne recommande pas.

D'après VEJAS (*Arch. f. Psychiatrie*, XVI, p. 200), une solution de 1/3000 colore en dix-huit à vingt-quatre heures des coupes durcies par le chromate de potasse suivi d'alcool, et beaucoup mieux que le carmin. La coloration est absolument stable.

JELGERSMA (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 39) obtient des résultats excellents avec l' « aniline blue-black », *à condition de n'employer que la préparation anglaise*. Il fait des solutions à 1/100, 1/800 et 1/2000, qui servent à colorer des coupes, la première en un quart d'heure, la seconde en cinq heures, la troisième en douze heures. On obtient une coloration spéciale des cellules ganglionnaires et de leurs prolongements, et des cylindres-axes. Les altérations pathologiques des cellules deviennent très évidentes. JELGERSMA préfère ce réactif au carmin pour l'étude des éléments que nous venons de nommer ; il est sans valeur pour la névroglie et le tissu conjonctif. Les préparations sont parfaitement permanentes.

Voyez aussi SCHMAUS, *Münch. med. Wochenschr.*, 8, 1891, p. 147 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 2, 1891, p. 230, qui recommande également cette couleur.

GIERKE (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 379) raconte qu'il n'a jamais pu obtenir de bons résultats avec les échantillons de noir d'aniline qu'il avait pu se procurer en Allemagne, et que le traitement par l'hydrate de chloral rend les tissus impropres à la conservation.

LUYS (*Gaz. méd. de Paris*, 1876, p. 346) préconise le noir d'aniline dit « noir Colin », solution à 0,1 p. 100, qu'on laisse agir pendant trois à quatre minutes.

MARTINOTTI (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 478) a fait des expériences

Digitized by Google

avec le noir d'aniline, et a trouvé, comme GIERKE, qu'il lui donnait des résultats bien inférieurs au carmin. Il en était de même avec la nigrosine, employée seule.

695. MARTINOTTI trouve que la *nigrosine* employée sous forme de *picro-nigrosine* donne de bons résultats, surtout pour l'étude des altérations pathologiques des centres nerveux. Il colore des coupes, obtenues par n'importe quel procédé de durcissement, pendant deux ou trois heures, ou même pendant deux à trois jours, si l'on veut, dans une solution saturée de nigrosine dans une solution alcoolique saturée d'acide picrique ; il lave à l'alcool et décolore dans un mélange de 1 partie d'acide formique avec 2 parties d'alcool, jusqu'à ce que les substances grises et blanches apparaissent clairement différenciées à l'œil nu ; il déshydrate par l'alcool, et éclaircit dans l'essence de bergamote.

695 *bis.* — La méthode de ROSIN (*Neurol. Centralb.*, XII, 1893, p. 1 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XII, 1, 1895, p. 77) consiste en l'emploi du *mélange Ehrlich-Biondi.*

696. KAISER (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 471) préconise une solution contenant 1 partie de brun de naphthylamine, 200 d'eau, et 100 d'alcool. Colorer des coupes pendant quelques heures.

697. REHM (*Münch. med. Wochenschr.*, 1892, n° 13; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 389) colore des coupes (de matériel durci à l'alcool) pendant une demi-minute dans une solution *chaude* de bleu de méthylène à 0,1 p. 100, différencie dans l'alcool, éclaircit à l'essence d'origan et monte au baume. Cellules nerveuses, bleu foncé ; cellules conjonctives plus claires et verdâtres.

698. — Pour obtenir une différence encore plus marquée entre les cellules nerveuses et les cellules conjonctives, REHM (*loc. cit.*) colore et différencie d'abord comme ci-dessus. Puis il met les coupes quinze à trente minutes dans une solution de fuchsine à 0,1 p. 100 dans l'alcool à 96 p. 100, différencie de nouveau à l'alcool, éclaircit à l'essence de girofle et monte.

Pour démontrer surtout les noyaux de cellules conjonctives et des vaisseaux sanguins, coloration pendant quelques minutes dans une solution aqueuse d'éosine à 1 p. 100, suivie d'une coloration de quel-

Digitized by Google

ques minutes dans une solution aqueuse chaude de dahlia à 0,1 p. 100. Ou bien, solution aqueuse de nigrosine à 1 p. 100 au lieu de l'éosine, puis solution alcoolique de fuchsine à 0,1 p. 100 pendant une demi-heure, au lieu de dahlia.

699. — Hématoxyline à l'acide phospho-molybdique de MALLORY, voy. *Anat. Anz.*, 1891, p. 375 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 341 ; *Les Coupes du Système nerveux central*, de MERCIER, p. 228.

700. — Méthodes d'UPSON (carmin à l'acide phospho-molybdique, carmin au sulfate de zinc, acide carminique suivi d'un mordant), voy. *Neurol. Centralb.*, 1888, p. 319; *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 4, 1888, p. 525.

Méthode similaire de SCHMAUS (carmin à l'urane); voir *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 439; Méthode de FREEBORN à l'acide carminique, voy., *ibid.*, 1889, p. 305.

701. Méthode au sublimé de GOLGI [1]. — C'est une méthode d'imprégnation, similaire à la classique méthode au bichromate d'argent du même anatomiste (n° 647), en ce qu'elle consiste en un traitement par le bichromate de potasse suivi d'un sel métallique, ce sel étant ici le sublimé corrosif. Elle procède ainsi (*Archivio per le scienze mediche*, 1878, p. 3). — Durcir dans le liquide de MÜLLER, ou dans une solution de bichromate de potasse dont on augmente graduellement la concentration de 1 p. 100 à 2,5 p. 100; il faut pour cela quinze à vingt jours, mais il vaut mieux prolonger le traitement jusqu'à vingt à trente jours. Il faut prendre de petites portions de tissu (de pas plus de 1 à 2 cc.) et de grandes quantités de liquide, qu'on renouvelle souvent de façon à le maintenir toujours clair. Mettre les pièces durcies directement dans une solution de sublimé corrosif de 0,25 à 50 p. 100; renouveler cette solution tous les jours pendant huit à dix jours.

Lorsque la réaction s'est accomplie, les tissus se montrent décolorés et présentent l'apparence de tissus frais. On peut les laisser indéfiniment dans le sublimé.

[1] Dans un manuel récent, celui de RAWITZ, cette méthode est appelée la *méthode lente de* GOLGI, et la méthode au bichromate d'argent (méthode *lente*) s'y appelle *méthode rapide de* GOLGI. C'est là une confusion regrettable. RAWITZ attribue la *méthode rapide* à RAMÓN Y CAJAL, ce qui est également erroné. De semblables confusions sont faites par MERCIER dans son manuel *Les Coupes du Système nerveux central.*

Digitized by Google

Dans *Rendic. R. Ist. Lombardo di Sc.*, Milan, 2, XXIV, 1891, p. 594, 656 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 388), Golgi dit que pour l'étude du réticulum nerveux diffus du système nerveux central on obtient les meilleurs résultats en conservant les pièces très longtemps dans le sublimé, jusqu'à deux ans dans certains cas.

Faire des coupes, et si on les destine à la conservation définitive, les laver dans de l'eau *à plusieurs reprises*, sinon elles seront détériorées par la formation d'un précipité noir. On peut les virer en les mettant pour quelques minutes dans un bain de virage et de fixation photographique, après quoi il est bon de les laver de nouveau, et de les colorer au carmin (ou mieux, à un carmin acétique). Monter au baume, ou, mieux, à la glycérine. Il n'est pas *nécessaire* de colorer, car les tissus sont imprégnés par le mercure ; ils paraissent blancs à la lumière réfléchie, noirs à la lumière transmise.

Les éléments mis en relief par ce procédé sont : 1° les cellules ganglionnaires et leurs prolongements, qui sont rendus plus évidents que par aucun autre procédé, si ce n'est le procédé au bichromate d'argent ; 2° les cellules du tissu conjonctif avec leurs prolongements rayonnants ; 3° les vaisseaux sanguins, avec leurs cellules musculaires.

Cette méthode est d'une application assez restreinte; elle ne donne des résultats *vraiment bons* qu'avec l'*Écorce du cerveau;* elle en donne de médiocres avec le cervelet, et fort peu de chose avec la moelle épinière. Elle ne démontre rien qui ne se laisse démontrer par la méthode au bichromate d'argent. Mais elle lui est supérieure en deux points : la réaction s'obtient toujours avec une parfaite sûreté, en un certain temps; et les préparations se laissent conserver parfaitement par les procédés ordinaires.

702. Modifications de la méthode au sublimé de Golgi. — Tal (*Gazz. degli Ospitali*, 1886, n° 68 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1887, p. 513) trouve qu'en traitant les coupes par une solution de sulfure de sodium, on obtient une coloration plus foncée. Il se forme un sulfure de mercure, noir. On peut colorer ensuite par le rouge Magdala. Le traitement au sulfure de sodium s'applique aussi avec avantage au procédé au bichromate d'argent.

Cox (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 16; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 420) a trouvé qu'on peut faire l'imprégnation au bichromate et au sublimé *en même temps*. Il emploie un liquide contenant 20 parties de bichromate de potasse à 5 p. 100, 20 de sublimé à 5 p. 100, 16 de chromate neutre de potasse à 5 p. 100, et 30 à 40 d'eau.

Digitized by Google

Le liquide doit être aussi peu acide que possible. La durée de l'imprégnation est de deux à trois mois. Les coupes sont d'une conservation assez difficile. Il convient de les faire par le procédé de la congélation, en évitant l'alcool, puis de les traiter pendant une heure à deux par une solution de carbonate de soude à 5 p. 100, et de monter au baume sans verre à couvrir. Cette méthode a été recommandée par Krause pour la rétine, et par Ramòn y Cajal pour la corne d'Ammon et le fascia dentata. Elle a entre autres l'avantage de ne pas produire de précipités superficiels sur les pièces.

Magini (*Boll. Accad. Med. di Roma*, 1886; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1888, p. 87) recommande l'emploi de chlorure de zinc au lieu de sublimé. Durcir pendant au moins deux à trois mois dans le liquide de Müller, bien laver à l'eau distillée, et mettre dans une solution de chlorure de zinc de 0,5 à 1 p. 100. Renouveler cette solution tous les jours pendant sept à dix jours (jusqu'à ce qu'elle ne prenne plus une teinte jaune foncé). Faire des coupes, laver rapidement à l'alcool, éclaircir dans la créosote et monter au baume.

Pour la modification compliquée de Flechsig, voyez *Arch. f. Anat. u. Phys.*, *Phys. Abth.*, 1889, p. 537 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, I, 1890, p. 71). Pour celle de Monti au sulfate de cuivre, *Atti R. Acc. dei Lincei, Roma, Rendic.*, V, 1889, p. 705 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, I, 1890, p. 72).

B. — COLORATIONS SPÉCIFIQUES

I. *Colorations myéliniques*[1].

703. Introduction. — Les colorations spécifiques des centres nerveux peuvent se diviser en *Colorations myéliniques*, ou celles qui sont destinées plus spécialement à mettre en relief les gaines de myéline afin de faciliter l'étude topographique des trajets des tubes nerveux à myéline; et en *Colorations cylindraxiles*, destinées à l'étude des rapports des cylindraxes et des prolongements plasmatiques des cellules nerveuses. Comme colorations myéliniques nous avons en première ligne la méthode à l'hématoxyline de Weigert, et ses congénères, avec quelques autres que nous mentionnerons. Comme colorations cylindraxiles nous avons surtout les méthodes de Golgi, déjà exposées dans le chapitre des nerfs périphériques, avec également quelques autres que nous mentionnerons.

[1] La classification suivante en colorations myéliniques et cylindraxiles ne doit pas être prise au pied de la lettre. Il n'y a guère de coloration myélinique *pure* que celle de Weigert (avec ses modifications).

Digitized by Google

704. Méthodes de Weigert. — Il y a eu en tout trois méthodes dues à Weigert pour des colorations myéliniques par des laques d'hématoxyline, à savoir, celle de 1884 (*Fortschr. d. Med.*, 1884, p. 113, 190; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 280, 564), qui repose sur la formation d'une laque *chromique;* celle de 1885 (*Fortschr. d. Med.*, 1885, p. 136; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 399, 484), qui repose sur la formation d'une laque *cuprique;* et celle de 1891 (*Deutsche med. Wochenschr.*, 42, 1891, p. 1184; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 392) qui repose également sur la formation d'une laque *cuprique*.

La première méthode a été abandonnée par l'auteur et nous la supprimons. Nous donnons la deuxième, qu'il importe de connaître aussi bien que la troisième.

705. Méthode de Weigert, 1885. — On se sert de tissus durcis dans le bichromate de potasse (nous pensons cependant que les liquides de Müller et d'Erlicki peuvent également servir). (On peut employer des tissus bruns ou des tissus devenus verts, pourvu qu'ils aient été bruns au préalable. Il est bon de les avoir traités pendant quelque temps par l'alcool, ce qui fait qu'il se forme moins facilement des précipités à leur surface.) Les pièces sont collées sur un liège avec de la celloïdine, durcies selon la méthode connue[1] et mises pendant un à deux jours dans une solution saturée d'acétate neutre de cuivre allongée d'un volume d'eau; on maintient le tout dans un incubateur. Après le traitement par le cuivre, les tissus sont devenus verts, le manteau de celloïdine est d'un vert bleu. On peut les conserver dans l'alcool à 80°.

On fait des coupes, avec un rasoir mouillé d'alcool, et on les transporte dans la solution colorante, où elles restent un temps variable, selon la nature des tissus : moelle épinière, deux heures; couches médullaires du cerveau, deux heures; couches corticales, vingt-quatre heures. La solution colorante est composée de :

Hématoxyline	0,75 à 1	partie.
Alcool	10	—
Eau	90	—
Solution saturée de carbonate de lithine . .	1	—

[1] Cela veut dire que le mordançage se pratique, ou peut se pratiquer, sur des pièces déjà préparées pour les coupes par inclusion dans le collodion; la solution de cuivre pénètre suffisamment à travers le collodion. C'est encore une qualité précieuse du collodion. Max Flesch (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 50) trouve que le mordançage dans la celloïdine entrave la coloration ultérieure qu'on peut désirer pratiquer par d'autres réactifs que l'hématoxyline, et préfère mordancer

Digitized by Google

(Au lieu de carbonate de lithine on peut ajouter une trace d'un autre alcali quelconque ; — le but de l'addition de l'alcali est de faire « mûrir » la solution d'hématoxyline. On est porté à penser, d'après les travaux de PAUL MAYER, qu'il serait plus rationnel de se servir d'hématéine pour avoir une solution instantanément mûre. M. HEIDENHAIN rapporte effectivement que l'hématéine va très bien. La question du prix de revient est une autre affaire.) — Il n'est pas nécessaire de tenir les coupes dans un incubateur pendant la coloration.

La coloration faite, les coupes sont rincées légèrement dans l'eau et passées dans la solution décolorante, où elles restent — une demi-heure à plusieurs heures — jusqu'à différenciation complète des nerfs. La solution décolorante se compose de :

Borax.	2,0	parties.
Ferricyanure de potassium	2,5	—
Eau.	200,0	—

On rince à l'eau et on passe par les alcools usuels pour monter dans le baume. Les tissus colorés par ce procédé peuvent être colorés ensuite par le carmin à l'alun pour la démonstration des noyaux.

Il est à remarquer que pour des objets très « difficiles » (nerfs pathologiques) on doit prendre la solution décolorante très allongée d'eau, et donner à la décoloration une durée proportionnellement prolongée. GELPKE (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 489) a trouvé que pour des coupes transversales de nerfs atrophiés il faut allonger la solution de cinquante volumes d'eau, et décolorer pendant douze heures pour le moins ; pour les coupes longitudinales, on peut employer une solution allongée de dix volumes d'eau.

La méthode est applicable à des pièces qui n'ont pas été durcies d'abord dans une solution d'un sel chromique, mais, par exemple, dans l'alcool, à condition de les mettre dans une solution d'un sel chromique jusqu'à ce qu'elles aient bruni, avant de passer au mordançage dans le cuivre.

Cette méthode est spécialement destinée à l'étude des trajets des tubes nerveux à myéline dans les centres nerveux. Les nerfs à myéline, d'un bleu noir, se détachent admirablement sur un fond doré. Nous pouvons témoigner qu'elle donne des résultats superbes. Mais elle s'applique aussi à l'étude de la distribution des nerfs périphériques, et nous pensons qu'elle sera d'un grand secours dans les recherches neurologiques de l'embryologie des Vertébrés.

ses coupes séparément. Il les porte dans la solution de cuivre sur du papier closet, et, après mordançage, il les porte sur une spatule dans de l'alcool à 70 degrés, et de là dans la teinture.

Digitized by Google

L'emploi de la solution d'hématoxyline de Weigert peut devenir assez coûteux si l'on jette la solution employée, surtout lorsqu'il s'agit de la coloration de pièces volumineuses. Nous devons à BERLINER BLAU (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 50) la méthode suivante pour la régénération des solutions employées : On ajoute à la solution qui a servi environ 2,5 à 5 p. 100 d'eau de baryte, on agite, et on laisse reposer vingt-quatre heures, puis on fait barboter de l'acide carbonique (obtenu en faisant agir sur du marbre de l'acide chlorhydrique brut) à travers la solution, après quoi on laisse reposer encore vingt-quatre heures et l'on filtre. La solution filtrée donne des colorations qui ne se distinguent en rien de celles données par la solution primitive.

PANETH (*ibid.*, 1887, p. 213) prépare la solution avec l'extrait de bois de campêche. Il fait dissoudre 1 partie de l'extrait commercial dans 90 parties d'eau avec 10 parties d'alcool. Il filtre et ajoute 8 gouttes de solution saturée de carbonate de lithine par 100 cc. du filtrate. Il faut de dix-huit à vingt-quatre heures pour colorer à la température normale.

BREGLIA (*ibid.*, VII, 2, 1890, p. 236) décrit un procédé essentiellement identique.

706. Méthode de WEIGERT, 1891. — Le matériel est durci au bichromate et enrobé dans la celloïdine comme dans la méthode précédente. On met les blocs durcis dans un mélange à parties égales de solution d'acétate neutre de cuivre, saturée à froid, et de solution à 10 p. 100 dans l'eau de sel de Seignette (tartrate double de potasse et de soude, $C^4H^4O^6KNa + 4H^2O$). On les y laisse vingt-quatre heures, à l'étuve (des pièces volumineuses, pont de Varole, etc., demanderont quarante-huit heures, et en ce cas il faut renouveler le liquide après vingt-quatre heures). On les met ensuite pour vingt-quatre heures dans une solution aqueuse d'acétate neutre de cuivre, soit saturée soit allongée d'un volume d'eau, et toujours à l'étuve. On les rince enfin dans l'eau et on les met dans de l'alcool à 80 p. 100; ils peuvent y rester indéfiniment, ou bien ils peuvent être mis en coupes au bout d'une demi-heure.

On fait des coupes isolées (et non pas des séries dans la celloïdine); elles ne doivent pas avoir plus de $0^{mm},025$. On les colore pendant quatre à vingt-quatre heures à la température du laboratoire, dans la teinture suivante, *fraîchement préparée.*

(A) 93 cc. d'eau, additionnée de 7 cc. de solution saturée de carbonate de lithine . . .	9 volumes.
(B) 1 gramme d'hématoxyline dissous dans 10 cc. d'alcool	1 —

(On peut garder séparément A et B en provision, mais A ne doit pas être trop vieux.)

On les lave à plusieurs eaux. On les passe par l'alcool à 90 p. 100, suivi d'un mélange d'acide phénique et xylol (n° 295), ou d'un mélange

Digitized by Google

de deux parties d'huile d'aniline avec une partie de xylol; enfin on pénètre de xylol pur et on monte dans le baume au xylol (il faut éviter le baume au chloroforme).

Comme résultat on a les nerfs à myéline d'un bleu foncé sur un fond clair, quelquefois rosé. Si l'on désire avoir le fond particulièrement incolore, prendre au lieu de la deuxième eau de lavage une solution de 1 volume d'acide acétique ordinaire dans 200 à 500 d'eau. Des coupes épaisses, ou des séries de coupes dans la celloïdine demanderont une différenciation spéciale. On peut prendre pour cela ou bien cette solution d'acide acétique, ou bien le liquide décolorant du numéro précédent allongé d'eau. En ce cas, on aura un fond jaune.

Les points de supériorité de cette méthode sur la méthode de 1885 sont que la différenciation après coloration n'est pas nécessaire; que les précipités fort gênants qui, dans l'ancienne méthode, se formaient très souvent à la surface des préparations, ne se produisent pas; que les manipulations sont plus faciles; et que les préparations sont égales en beauté à celles de Pal (plus loin), et qu'on les obtient avec plus de certitude.

Il existe un inconvénient. Ces préparations, faites *sans différenciation* dans le liquide ferricyanique, *ne se conservent pas bien*. En conséquence, Weigert (*Ergebnisse der Anat.*, III, 1894, p. 21) conseille de procéder comme ci-dessus par mordançage avec le sel de Seignette (ce qui a pour effet d'écarter les précipités superficiels), mais de *pratiquer aussi la différenciation par le ferricyanure*, comme dans l'ancienne méthode.

Modifications de la méthode de Weigert.

707. Modification de Max Flesch (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 564). — C'est une modification du procédé à la laque *chromique* de 1884. Elle consiste essentiellement en ce qu'on mordance les *coupes* (et non le matériel en bloc) par une immersion de quelques minutes dans de l'acide chromique à 0.5 p. 100 au lieu de solution cuprique. Le reste comme dans le procédé de Weigert. On n'a pas besoin d'une étuve. Les cellules nerveuses sont plus ou moins colorées (*loc. cit.*, 1887, p. 51).

708. Méthode de Pal (*Wien. med. Jahrb.*, 1886; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, I, 1887, p. 92; *Med. Jahrb.*, 1887, p. 589; *Zeit.*, 1888, p. 88). — On procède comme dans la méthode de Weigert, mais sans mordançage par le cuivre, jusqu'à la sortie des coupes du bain d'hématoxyline (c'est donc un procédé à laque *chromique*). On lave les coupes à l'eau; si elles ne sont pas déjà d'un bleu foncé, on ajoute à l'eau de lavage une trace de carbonate de lithine. On les met pour

Digitized by Google

vingt à trente secondes dans un premier bain de différenciation, qui consiste en une solution de permanganate de potasse à 0,25 p. 100. On rince à l'eau, et on met pour quelques secondes dans un deuxième bain décolorant, consistant en

Acide oxalique	1
Sulfite[1] de potassium (Kalium sulfurosum, SO_3K_2). .	1
Eau distillée	200

La substance grise des coupes se décolore, comme nous l'avons dit, en quelques secondes, la substance blanche restant bleue. On lave bien à l'eau, et on pratique, si l'on veut, une deuxième coloration au rouge Magdala, à l'éosine, au picrocarmin ou au carmin acétique.

Outre les mémoires cités, consulter, pour des détails minutieux de pratique, *Das Mikroskop* de BEHRENS, KOSSEL u. SCHIEFFERDECKER, I, p. 199; puis *Les Coupes du système nerveux central* de MERCIER, p. 197.

Comme résultat, on a des préparations plus brillantes d'aspect que celles de WEIGERT. La différence capitale est que par le procédé de PAL le fond est *totalement décoloré*. Mais il y a un inconvénient. Le procédé est moins certain, ou, si l'on veut, plus difficile à exécuter. Cela tient à ce que la différenciation est extrêmement énergique et par trop rapide. Elle ne dure en tout que quelques secondes; on comprend donc combien il est facile de dépasser la juste mesure.

709. Modification de SCHAFER (je n'ai pas pu trouver la source, et je cite d'après *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 398). — Mettre les coupes dans le liquide de MARCHI (n° 672 ; temps pas indiqué), puis rincer à l'eau, colorer (hématoxyline, 1 gramme, acide acétique, 2 cc., eau 100 cc.). Développer par la méthode de PAL.

710. Modification de KAISER (*Neurol. Centralb.*, XII, 1893, n° 11, p. 363, 364 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 2, 1894, p. 249). — Mettre les pièces dans du liquide de Müller. Après deux à trois jours les débiter en tranches de 2 à 4 millimètres d'épaisseur, et les remettre dans du liquide de Müller pour encore cinq à six jours. Mettre pour huit jours dans le liquide de MARCHI (n° 672). Laver, passer par l'alcool et enrober dans la celloïdine. Mordancer les coupes pendant cinq minutes dans un mélange composé de

Liquor ferri sesquichlorati	1
Eau distillée	1
Alcool (spirit. rectif.).	3

[1] Pas *sulfure*, comme il est dit par erreur dans *Les Coupes du système nerveux central* de MERCIER, p. 198.

Digitized by Google

Rincer dans l'hématoxyline de WEIGERT, qu'on renouvelle une fois, et y chauffer les coupes (pas jusqu'à ébullition) pendant quelques minutes. Lavage à l'eau et différenciation par le procédé de PAL. Neutraliser l'acide oxalique par un lavage dans de l'eau ammoniacale.

Je pense que l'auteur regarde comme superflus les procédés qu'il a donnés dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 4, 1893, p. 468 (coloration à l'aide de la chaleur, mordançage comme ici, et deuxième coloration à la fuchsine ou au brun de naphthylamine).

711. Modification de LISSAUER (et de SACHS) (*Centralb. f. Nervenheilk.*, XV, 1892, p. 330 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 391). Des coupes de matériel durci dans le liquide de Müller sont mordancées en les chauffant dans de l'acide chromique à 1 p. 100 jusqu'à ébullition commençante. Rincer et colorer en chauffant de même dans l'hématoxyline de WEIGERT. Différenciation d'après PAL. Ceci est essentiellement une *méthode rapide;* elle n'exige pas que les pièces aient séjourné longtemps dans le liquide de Müller.

712. Modification rapide de VASALE (*Rivista sper. di Freniatria*, XV, 1889, p. 902 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 518). — Des coupes de matériel durci au liquide de Müller ou au bichromate pur, sont colorées *d'abord* dans l'hématoxyline, puis traitées pour le même temps par une solution saturée d'acétate neutre de cuivre, lavées à l'eau et différenciées dans le liquide décolorant de WEIGERT allongé d'un volume d'eau.

713. Méthode de KULTSCHITZKY (*Anat. Anz.*, 1889, p. 223, et 1890, p. 519 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 2, 1889, p. 196, et VII, 3, 1890, p. 367 ; nous ne citons que le plus récent des deux procédés décrits). — Durcir pendant un mois ou deux dans le liquide d'Erlicki, faire des coupes à la celloïdine. Les mettre pour une à trois heures, ou jusqu'à vingt-quatre heures dans une teinture composée de 1 gramme d'hématoxyline dissous dans un peu d'alcool et ajouté à 100 cc. d'acide acétique à p. 100. Les laver dans une solution saturée de carbonate de lithine ou de soude. (En ajoutant au carbonate de lithine un dixième de solution à p. 100 de ferricyanure de potassium, et en y décolorant pendant deux à trois heures ou plus, on y obtient une différenciation plus belle.) Bien laver à l'eau et monter au baume.

WOLTERS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 466) a modifié ce procédé en colorant à l'étuve à 40° C. et en différenciant par la méthode de PAL, après avoir plongé les coupes pour un instant dans du liquide de Müller.

La modification de KAES (*Neurol. Centralb.*, 1891, n° 15 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 388) consiste à colorer à l'étuve pendant deux à trois jours, à traiter par le liquide de Müller, et à faire la différenciation d'après PAL en plusieurs reprises.

Digitized by Google

714. Méthode rapide de Berkley (*Neurol. Centralb.*, XI, 9, 1892, p. 270 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 370). — Des portions de tissu de pas plus de $2^{mm},5$ d'épaisseur sont durcies pendant vingt-quatre à trente heures dans le mélange de Flemming à une température de 25° C. Sans lavage, on les met dans l'alcool absolu qu'on renouvelle deux fois dans les premières vingt-quatre heures. Après durcissement suffisant, celloïdine pendant douze à vingt-quatre heures. Coupes. Laver les coupes à l'eau et les mettre pour une nuit dans une solution saturée d'acétate de cuivre (ou bien les y chauffer à 35 à 40° C. pendant trente minutes, puis laisser refroidir). Laver et chauffer à 40° C. pendant quinze à vingt-cinq minutes dans la solution d'hématoxyline, laisser refroidir et différencier (une à trois minutes) dans le liquide ferricyanique de Weigert, allongé ou non d'un tiers d'eau. Eau, alcool, essence de bergamote, baume au xylol.

La solution colorante de Berkley se fait ainsi : on porte à ébullition 50 cc. d'eau, on y ajoute 2 cc. de solution saturée de carbonate de lithine, on fait bouillir pendant encore une minute, et l'on ajoute 1,5 à 2 cc. d'une solution d'hématoxyline à 10 p. 100 dans l'alcool absolu.

Cette méthode s'applique surtout à des tissus frais et ne donne pas de bons résultats avec ceux qui ont subi le ramollissement *post mortem*.

715. Autres modifications ou méthodes similaires... Flechsig. *Arch. f. Anat. u. Phys.*, *Phys. Abth.*, 1889, p. 537 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 1890, p. 71 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1890, p. 538 ; Breglia, *Zeit.*, VII, 2, 1890, p. 36 ; Rossi, *ibid.*, VI, 2, 1889, p. 182 ; Mercier, *ibid.*, VII, 4, 1891, p. 480 ; Haug, *ibid.*, VII, 2, 1890, p. 153 ; Walsem, *ibid.*, XI, 2, 1894, p. 236.

AUTRES COLORATIONS MYÉLINIQUES

716. Méthode de l'osmium (Exner, *Sitzb. d. k. Akad. Wiss. Wien*, 1881 ; Bevan Lewis, *The human brain*, p. 105). — On met des portions de cerveau (qui ne doivent pas avoir plus de 1 centimètre de côté) dans l'acide osmique à 1 p. 100. On renouvelle la solution à la fin du deuxième et du quatrième jour. Le durcissement est en général achevé au bout de cinq à dix jours. Laver à l'eau. Eclaircir les coupes par une goutte d'ammoniaque caustique. Couvrir et monter dans du verre soluble. (Ajoutons que la permanence de semblables préparations nous paraît plus que douteuse.)

Bellonci (*Arch. Ital. de Biol.*, VI, p. 405) a employé cette méthode dans

Digitized by Google

ses recherches sur le nerf optique des Mammifères. Elle a l'avantage de donner des préparations dans lesquelles la masse générale du tissu cérébral est décolorée par l'ammoniaque, les tubes nerveux à myéline restant noirs. Bellonci prend l'acide osmique de 0,5 à 1 p. 100; il durcit seulement quatorze à vingt heures, traite les coupes trois à quatre heures par l'alcool à 80°, puis par l'ammoniaque.

717. — Parmi les colorations plus ou moins spécifiques des gaines de myéline, il faut encore citer la méthode de PALADINO (n° 670), celle de ZIEHEN au sublimé et à l'or (n° 725), etc.

2. *Colorations de cylindraxes et de prolongements cellulaires.*

718. Revue. — La plupart des procédés appartenant à cette catégorie ont déjà été donnés. Ce sont avant tout les méthodes de GOLGI, que nous avons placées, pour des motifs de commodité surtout, dans le chapitre des *Nerfs périphériques*, et dans les *Colorations générales ;* puis d'autres méthodes qu'on trouvera également dans ces deux chapitres et au chapitre des *Imprégnations* (Or) de la *Première Partie*. Il nous en reste plusieurs à mentionner, dont une ou deux assez importantes, celle de WOLTERS, par exemple.

719. Méthode au vanadium de WOLTERS. — Nous l'avons donnée au numéro 671. Elle s'applique également au système nerveux central et aux organes périphériques.

720. Méthode de SAHLI (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 1). — Des coupes de tissu durci par le bichromate au degré voulu pour la coloration à l'hématoxyline de Weigert, sont lavées pendant pas plus de cinq à dix minutes à l'eau, et colorées pendant plusieurs heures (jusqu'à coloration bleue foncée) dans une solution aqueuse concentrée de bleu de méthylène. On les rince à l'eau et on les colore pendant cinq minutes dans une solution saturée de fuchsine acide (« Säurefuchsine ») dans l'eau. Si maintenant on rince à l'alcool, et si l'on porte les coupes dans beaucoup d'eau, la coloration se différencie, et l'on obtient de très belles images, les cylindres de l'axe se montrant colorés en rouge, les gaines de myéline en bleu. Mais si, au lieu de les rincer à l'alcool pur, on les traite pendant quelques secondes par de l'alcool contenant 1/100 ou 1/1000 de potasse caustique, puis par l'eau pour différencier la coloration, ensuite par l'alcool et l'essence de cèdre suivie de baume dissous dans l'essence de cèdre, on obtient des images encore plus nettes. Les cylindres sont toujours rouges, mais les gaines de myéline se montrent tantôt rouges, tantôt bleues. Sahli pense que cette réaction indique une différence de nature dans les tubes nerveux qui en sont le siège, et qui se montrent parfaitement identiques vis-à-vis des autres méthodes de coloration.

Le même auteur (*loc. cit.*, p. 50) donne la méthode suivante pour la

Digitized by Google

coloration spécifique des tubes nerveux par le *bleu de méthylène* seul. Des coupes de matériaux durcis comme pour le procédé de Weigert sont colorées pendant quelques minutes à quelques heures dans la teinture suivante :

Eau.	40	parties.
Solution saturée de bleu de methylène dans l'eau .	24	—
Solution de borax à 5 p. 100	16	—

(Mêler ensemble, laisser reposer un jour et filtrer.)

On lave les coupes soit dans l'eau, soit dans l'alcool, jusqu'à ce que la substance grise soit nettement distincte de la blanche, on éclaircit à l'essence de cèdre, et on monte au baume. Les tubes nerveux se montrent colorés en bleu, les cellules ganglionnaires sont verdâtres, les noyaux de la névroglie sont bleus. Malheureusement Sahli n'a pas encore pu trouver de moyen sûr pour conserver ces belles préparations. La méthode a l'avantage de colorer en même temps des Micrococcus, s'il s'en trouve dans les tissus.

721. — *La safranine suivie de bleu de méthylène* donne une coloration très spéciale de la moelle épinière. Voici comment procède ADAMKIEWICS (*Sitzber k. Acad. Wiss. Wien, Math. Naturw. Kl.*, 1884, p. 245 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 587) ; on fait des coupes de matériel durci au liquide de Müller durant pas moins d'un mois et pas plus de trois mois. Il faut les laver à l'eau, puis dans de l'eau avec un peu d'eau d'acide nitrique, colorer dans une solution concentrée de safranine, rincer d'abord dans l'alcool, puis dans l'alcool absolu, et traiter par l'essence de girofle jusqu'à ce que les coupes ne cèdent plus de couleur. Puis revenir à l'eau, laver dans l'eau acidulée par l'acide acétique, colorer par le bleu de méthylène et traiter par les alcools et l'essence comme auparavant.

722. — La modification de cette méthode par NIKIFOROW (*Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 3, 1888, p. 338) consiste à pratiquer une imprégnation au chlorure d'or ou autre sel métallique après la coloration par la safranine.

723. — A la méthode d'ADAMKIEWICS se rattachent aussi les méthodes de CIAGLINSKI, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 1, 1891, p. 19, et de STROEBE, *ibid.*, X, 3, 1893, p. 336, les deux à la safranine suivie de bleu d'aniline. Voir au besoin *Les coupes du système nerveux central* de MERCIER, page 227. On peut y lire également une méthode de NISSL à la fuchsine, dont je n'ai pas pu trouver la source. La méthode de NISSL au rouge Congo se trouve dans *Münchener med. Wochenschr.*, 1886, page 528 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 3, 1886, p. 398).

724. Méthodes de Rehm (*Münchener med. Wochenschr.*, 1892, n° 13 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 390). — Des coupes sont colorées pendant quelques minutes dans une solution concentrée de rouge Congo dans l'eau, lavées à l'alcool et traitées pendant dix minutes, jusqu'à devenir bleues, par l'alcool contenant de l'acide chlorhydrique ou nitrique, éclaircies à l'essence d'origan et montées.

Digitized by Google

Ou bien, on prend des coupes de matériel durci à l'alcool, on les met pour un jour ou deux dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 0,5 p. 100, on les lave dans une solution aqueuse de carbonate de lithine (concentration pas indiquée) jusqu'à ce qu'elles ne rendent plus de couleur, on déshydrate et on monte.

725. Méthode de ZIEHEN (*Neurol. Centralb.*, X, 1891, n° 3, p. 65 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 385). — C'est une modification de la méthode au sublimé de GOLGI. On met de petits morceaux de matériel frais dans une quantité considérable d'un mélange à parties égales de solution de sublimé à 1 p. 100 et de solution de chlorure d'or au même titre. On les y laisse au moins trois semaines, ou mieux jusqu'à cinq mois ; ils doivent à ce moment avoir pris une coloration brun rouge. On les colle sur un liège et on fait des coupes sans enrobage. On traite les coupes ou bien par de la solution de LUGOL (n° 86) allongée de 4 volumes d'eau, ou bien simplement par de la teinture d'iode diluée. Après une différenciation suffisante on lave et on monte au baume. Coloration d'un gris bleuâtre ; les gaines de myéline sont colorées en même temps que les cylindraxes et les cellules nerveuses et névrogliques.

726. Méthodes d'UPSON au chlorure d'or, etc. (*Neurol. Centralb.*, 1888, p. 319 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1888, p. 525, et VII, 4, 1891, p. 474.) — Ces méthodes sont *extrêmement compliquées*, et, sans doute pour ce motif, n'ont pas trouvé beaucoup d'amateurs. On pourra au besoin les lire dans *Les coupes du système nerveux central* de MERCIER, page 234.

727. Autres méthodes. GERLACH, *Stricker's Handb.*, p. 678. BOLL, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 403 ; SCHIEFFERDECKER, *Arch. f. mik. Anat.*, 1874, p. 472 ; FREUD, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, 1884, p. 453 ; (toutes, comme celles d'UPSON, des méthodes au chlorure d'or). MERKEL, *Arch. f. mik. Anat.*, 1877, p. 622 (procédé de demi-éclaircissement). BEVAN LEWIS, *The Human Brain*, p. 122 (procédé pareil). GIACOMINI, *Arch. per le Sci. Mediche*, 1878, p. 11 ; MAX FLESCH, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 507 (procédés de conservation macroscopique à sec). BEVAN LEWIS, *Mon. Mic. Journ.*, 1876, p. 106 ; *Human Brain*, p. 146 (préparation de tissus frais par compression). GIERKE, *Arch. f. mik. Anat.*, 1885, p. 444 (étude de la névroglie). ARONSON, voir *Les Coupes du Système nerveux central*, de MERCIER, p. 255 (coloration à la galléine). KULTSCHIZKY, *Anat. Anz.*, VIII, 1893, p. 357-361 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 256 (rubine acide pour névroglie). SCHAFFER. *Anat. Anz.*, IX, 1894, p. 262 ; *Arch. f. mik. Anat.*, 44, I, 1894, p. 27.

Digitized by Google

CHAPITRE XXXII

AUTRES TISSUS ET AUTRES ORGANES

Nous n'avons dans ce chapitre, pas plus que dans les précédents ou les suivants, l'intention de traiter des divers tissus et des divers organes d'une manière systématique. Ce sujet a été traité magistralement par RANVIER, *dans un livre qui est entre les mains de tous. Nous y renvoyons le lecteur et nous nous bornons à rassembler ici quelques notes sur des détails de technique plus récents que le* TRAITÉ *classique de* RANVIER.

TISSU CONJONCTIF, OSSEUX ET CARTILAGINEUX

728. Tissu conjonctif. — Coloration par le violet B (MAYER, *Sitzb. k. Akad. Wiss.*, LXXXV, 1882, p. 69). — Mayer recommande, pour l'étude de tissus frais, une solution de 1 gramme de violet B (de Bindschedler et Busch à Bâle) dans 300 cc. d'une solution de sel de cuisine à 0,5 p. 100. Dans cette solution les cellules fixes du tissu conjonctif se colorent très rapidement et d'une façon très énergique. Les fibrilles élastiques et les muscles lisses s'y colorent également, mais en prenant d'autres nuances, ce qui permet de les distinguer très facilement.

729. Colorations spécifiques de la substance collagène. — Nous avons donné (n° 613) une méthode de KROMAYER (dérivée de la méthode pour la fibrine de WEIGERT), n° 747, pour la démonstration de la « fibrillation » des cellules épithéliales. Or il a été trouvé par BENECKE (*Verh. d. Anat. Ges.*, *VII Vers.*, 1893, p. 165 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, I, 1894, p. 79) que le procédé de WEIGERT peut fournir également une coloration spécifique des fibrilles collagènes. Il convient

Digitized by Google

pour cela de prendre pour la décoloration un mélange plus faible en aniline, 3 parties de xylol pour une d'aniline. Les fibrilles collagènes sont bleues, le tissu élastique rougeâtre.

UNNA (*Monatschr. f. prakt. Dermatol.*, XVIII, 1894, p. 509 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 4, 1894, p. 518) donne plusieurs méthodes pour ces colorations. I. *Méthode à l'orcéine.* On fait des coupes de matériel durci à l'alcool. On les colore pendant cinq minutes dans la solution « polychromique » de bleu de méthylène de GRÜBLER. On les porte pour quinze minutes dans une solution neutre d'orcéine à 1 p. 100 dans l'alcool absolu. Rincer à l'alcool absolu ; essence de bergamote, baume. Noyaux bleus, substance collagène rouge foncé. Les granules des « Mastzellen » sont d'un rouge carmin, le protoplasma des cellules plasmatiques (Plasmazellen) bleu. — II (*a*) Colorer cinq à dix minutes dans une solution aqueuse de fuchsine acide à 2 p. 100, rincer, mettre pour une à deux minutes dans une solution saturée d'acide picrique dans l'eau, déshydrater (deux minutes) dans l'alcool absolu saturé d'acide picrique, rincer à l'alcool pur, essence, baume. (*b*) Colorer pendant vingt secondes dans une solution aqueuse à 1 p. 100 de « Wasserblau » (Bleu alcali), rincer, mettre pour cinq minutes dans une solution aqueuse neutre de safranine à 1 p. 100. Rincer, mettre dans l'alcool absolu jusqu'à ce que la couleur bleue reparaisse ; essence de bergamote, baume. Substance collagène d'un bleu clair, noyaux rouges.

A consulter aussi, outre RANVIER, *Traité*, p. 329, FREEBORN (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1889, p. 305 (picro-nigrosine) ; FLEMMING, *Zeit. f. wiss. Mik.* IX, 2, 1892, p, 225 ; PIANESE, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 292.

730. Tissu adipeux. — Il a été découvert par DEKHUYSEN (cf. FLEMMING, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1889, p. 39, 178) que la graisse qui a été noircie par le mélange chromo-acéto-osmique (non pas celle qui a été noircie par l'acide osmique pur) se laisse dissoudre en peu d'heures dans l'essence de térébenthine. Elle peut se dissoudre aussi dans le xylol, l'éther et la créosote. FLEMMING a trouvé qu'on fait d'excellentes préparations didactiques en traitant du tissu adipeux par le mélange chromo-acéto-osmique, en colorant à la safranine ou au violet de gentiane, et en traitant pendant quelques heures par l'essence de térébenthine. L'inconvénient causé par la forte réfringence de la graisse étant ainsi éliminé, on peut étudier les noyaux et le cytoplasme dans des conditions beaucoup meilleures que dans les préparations ordinaires.

731. Cellules à granulations, « Plasmazellen, Mast-

Digitized by Google

zellen ». — En 1874, WALDEYER décrivit (*Arch. f. mik. Anat.*, XI) entre les faisceaux du tissu conjonctif, outre les cellules plates, les cellules lymphatiques et les cellules adipeuses, d'autres cellules spéciales. Ce sont des cellules grandes, rondes, à grosses granulations ; il les nomma « *Plasmazellen* ». Plus tard EHRLICH (*Arch. f. mik. Anat.*, XIII, 1877) étudiant plus à fond ces cellules, est arrivé à distinguer dans le même tissu et dans d'autres organes des cellules à grosses granulations qui paraissaient de prime abord pareilles aux premières, mais qui sont cependant, comme le montrent leurs réactions, de nature différente (EHRLICH, *Verh. d. Berliner Physiol. Gesell.*, 17 Jan. 1879 ; *Reichert u. Du Bois Reymond's Arch.*, 1879, p. 166). Ces dernières sont les *Mastzellen* ou cellules à granules, d'Ehrlich ; le nom de « Mastzellen » exprimant la croyance que ces cellules dérivent des cellules conjonctives fixes par suite d'une transformation provoquée par une exagération de leur nutrition.

Nous pouvons dire de ces cellules, d'une manière générale, qu'elles se laissent colorer par la plupart des anilines, et retiennent leur couleur au lavage par les acides ou par l'alcool absolu avec plus de ténacité que les cellules normales des tissus. Ce qui est caractéristique de ces éléments — du moins des véritables *Mastzellen* d'Ehrlich, c'est qu'ils présentent dans les préparations réussies, le noyau incolore, le protoplasma peu ou point coloré, et dans ce protoplasma les granulations caractéristiques colorées d'une manière intense.

Les granulations cellulaires ressemblent souvent fort à des bactéries, et se colorent de même. Pour les en distinguer, il suffit de traiter, après coloration par exemple par le dahlia, par une faible solution de carbonate de potasse ; les granules se décolorent, mais pas les bactéries (SQUIRE, *Methods and Formulæ*, p. 46).

732. Cellules à granulations, « Plasmazellen » (EHRLICH, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, XIII, p. 263).

Première méthode. C'est une propriété de la solution aqueuse neutre de dahlia de colorer en général le protoplasma et la substance fondamentale des tissus, en laissant les noyaux incolores. Si, après coloration, on traite les tissus par l'eau acidifiée par l'acide acétique, la coloration est extraite de la substance fondamentale et du protoplasma, et est absorbée par les noyaux, et l'on a comme résultat une coloration qui ressemble à celle que donne la teinture normale par l'hématoxyline. S'il y a des cellules « plasmatiques » dans la préparation, elles se distinguent de suite par l'énergie supérieure avec laquelle elles prennent la coloration. Pour conserver les prépara-

Digitized by Google

tions, on les déshydrate par l'alcool absolu et on les monte dans une solution de colophane dans l'essence de térébenthine.

733 (Ehrlich, *ibid.*). — *Deuxième méthode, pour obtenir la coloration spécifique des cellules plasmatiques seules.*

Les tissus doivent être bien durcis dans l'alcool fort (l'acide chromique et les sels chromiques doivent être évités). On colore pendant au moins douze heures dans la teinture suivante :

Alcool absolu	50 cc.
Eau	100 gr.
Acide acétique cristallisable	12 gr. 5.
Dahlia, assez pour donner une solution presque saturée.	

Après coloration, on porte les tissus dans l'alcool, où tous les éléments se décolorent à l'exception des cellules plasmatiques, et l'on monte dans la solution de colophane dans l'essence de térébenthine.

Le degré de coloration qu'on obtient dans l'alcool dépend du degré d'acidité de la teinture. Ehrlich a trouvé que la teinture qui ne contenait que 7,5 cc. d'acide acétique cristallisable donnait une coloration d'intensité moyenne. On peut donc employer des proportions plus faibles d'acide pour les préparations riches en tissu conjonctif, tandis que pour d'autres la formule que nous avons donnée est à préférer.

Les cellules mucipares et adipeuses se colorent quelquefois dans cette teinture.

On peut employer de la même manière (en solution aqueuse avec 5 p. 100 d'acide acétique), la primula, le violet d'iode, le violet de méthyle, la purpurine artificielle, la safranine, la fuchsine ; c'est le violet de méthyle qui donne les meilleurs résultats.

734. Cellules plasmatiques (Korybutt-Daskiewicz ; *Arch. f. mik. Anat.*, 1878, XV, p. 7). — Si l'on conserve des Grenouilles pendant deux mois (d'été) sans nourriture, qu'on les place ensuite dans un réservoir d'eau courante et qu'on les nourrisse bien pendant quatre semaines, on trouvera des cellules « plasmatiques » en abondance. La meilleure manière de faire des préparations permanentes est de fixer des nerfs dans l'acide osmique à 0,5 pour 100, de colorer au dahlia d'Ehrlich (formule précédente), au violet de méthyle, à la fuchsine, ou avec une autre couleur d'aniline, de déshydrater à l'alcool, et de monter dans de la térébenthine.

735. Nordmann (*Beitr. z. Kenntniss d. Mastzellen, Inauguraldiss.*, Helmstedt, 1884). — Nordmann trouve qu'il y a utilité à employer une solution de vésuvine contenant 4 à 5 p. 100 d'acide chlorhydrique. Les coupes doivent séjourner quelques minutes dans cette solution, et, après

Digitized by Google

coloration, la préparation peut être déshydratée par l'alcool absolu. Par ce procédé les cellules plasmatiques se colorent avant les noyaux des tissus et gardent leur couleur plus longtemps dans l'alcool absolu.

Dans le travail que nous citons on trouvera une discussion détaillée des réactions microchimiques des cellules plasmatiques.

736. Cellules plasmatiques et Mastzellen. — Les trois formules suivantes sont données par UNNA, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 4, 1892, p. 475.

a. *Pour cellules plasmatiques.*

Bleu de méthylène	1,0
Potasse caustique	0,05
Eau distillée	100,0

A allonger de 10, 50 ou 100 volumes d'eau anilinée. Colorer des coupes (de matériel alcoolique ou au sublimé, pas à l'acide chromique) pendant une demi-heure à plusieurs heures. Déshydrater rapidement à l'alcool absolu, différencier dans du créosol (pas de détails), rincer au xylol, baume.

b. *Coloration générale, démontrant les cellules plasmatiques.*

Bleu de méthylène	1,0
Carbonate de potasse	1,0
Eau distillée	100.0
Alcool	20,0

Réduire à 100 en chauffant au bain-marie. Pour colorer, employer tel quel, ou allongé d'un volume d'eau anilinée. Différencier (point de détails) dans du glycol, du styrone ou du créosol. Cette méthode ne différencie pas les « Mastzellen ».

c. *Pour avoir les Mastzellen rouges avec les cellules plasmatiques bleues.*

Bleu de méthylène	1,0
Carbonate de potasse (ou de soude ou d'ammoniaque)	1,0
Eau distillée (ou phéniquée, ou chloroformée)	100,0

Allonger d'eau en raison de 100 : 1, colorer lentement, traiter par l'alcool à 70 ou 80 p. 100, différencier dans du styrone ; essence de bergamote ou xylol, baume. Dans un autre travail, *Monatschr. f. prakt. Dermatol.*, XII, 1891, p. 296 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 92), UNNA donne quelques détails au sujet de la différenciation

Digitized by Google

au créosol. Le créosol ne fait que différencier la coloration, il ne déshydrate pas les coupes. Il faut d'abord sécher les coupes au papier buvard, et les traiter par l'alcool absolu ou par l'huile d'aniline pour quelques secondes avant d'appliquer le créosol. La différenciation demande de quelques minutes à quelques heures. Lorsqu'on a atteint le degré voulu de différenciation, on le fixe avec le xylol, et l'on monte.

A consulter aussi, VAN DER SPEK und UNNA, *Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 1, 1892, p. 89 ; UNNA, *Monatschr. f. prakt. Dermatol.*, XIX, 1894, p. 225 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XII, I, 1895, p. 58 ; MARSCHALKÒ, *ibid.*, p. 64 ; JADASSOHN, *Arch. f. Dermatol. u. Syphilis*, *Ergänzungsh.* 1, 1892, p. 58 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 2, 1892, p. 226.

737. Cellules plasmatiques et Mastzellen. *Méthode de* BERGONZINI (*Anat. Anz.*, VI, 1891., p. 595 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, I, 1892, p. 95). — Fuchsine acide à 0,2 p. 100, 1 volume ; vert de méthyle à 0,2 p. 100, 2 volumes ; Goldorange à 0,2 p. 100, 2 volumes. Mêler et filtrer à travers du coton. Colorer deux ou trois minutes ; eau, alcool, essence. Les granules basophiles doivent être verts, les acidophiles rouges ou oranges, les noyaux verts. On peut au besoin prendre de l'orange G au lieu de Gold-orange.

738. Tissu élastique. — Les fibres élastiques ne sont pas changées par la soude ou la potasse caustique ; elles ont une affinité marquée pour l'acide osmique et pour certaines couleurs d'aniline, surtout pour le bleu Victoria. Sur ce caractère se fonde la méthode de LUSTGARTEN, numéro 170. La couleur employée par LUSTGARTEN s'appelait Victoriablau 4B.

Pour une revue de méthodes anciennes de BALZER, UNNA, et HERXHEIMER, voir le travail de MARTINOTTI dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 1, 1887, p. 31.

Méthode de MARTINOTTI, *loc. cit.* — Fixer dans un liquide chromique, colorer pendant quarante-huit heures dans une forte solution de safranine et monter au baume. Fibres élastiques, noires.

Pour des modifications de détail de cette méthode, voir GRIESBACH, *ibid.*, IV, 1887, p. 442 ; et FERRIA, *ibid.*, V, 3, 1888, p. 342, et MIBELLI, *ibid.*, VII, 2, 1890, p. 225.

Méthode à l'orcéine. — Due à TAENZER, cette méthode a été modifiée ainsi qu'il suit par UNNA (*Monatsch. f. Prakt. Dermatol.*, XII, 1891, p. 394 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 94). On fait dissoudre

Digitized by Google

0.1 gramme d'orcéine de Grübler dans 20 grammes d'alcool à 95 p. 100 additionné de 5 grammes d'eau, et l'on prépare aussi un mélange de 1 gramme d'acide chlorhydrique concentré dans une quantité pareille d'alcool et d'eau. On prend de 6 à 10 verres à montre et l'on met dans chacun 10 gouttes de la teinture. Puis on acidifie ces doses par le mélange acide, en ajoutant 5 ou 10 gouttes pour le premier verre, et en augmentant à raison d'une goutte de plus pour chaque verre successif. On met une ou deux coupes dans chaque verre, et on les laisse douze heures. On les examine dans une goutte de glycérine et on choisit les préparations réussies. Elles doivent montrer les fibres élastiques en brun saturé sur fond plus clair. On peut colorer les noyaux par une autre teinture si on le désire. A consulter aussi au sujet de cette méthode ZENTHOEFER, *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 4, 1893, p. 509.

Autres méthodes. — KOPPEN, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 473 et VII, 1, 1890, p. 22. BURCI, voir *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 831, et 1892, p. 292. WOLTERS (hématoxyline au chlorure de vanadium), *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 360. MARTINOTTI, *ibid.*, V, 4, 1888, p. 521, et BEHRENS, KOSSEL et SCHIEFFERDECKER, *Das Mikroskop*, 1, p. 204.

TISSU OSSEUX [1]

739. Os et dents non décalcifiés. — Outre l'important procédé de RANVIER pour la préparation de coupes d'os par la voie sèche qu'on trouvera à la page 297 du *Traité technique* de cet auteur, nous rappelons les procédés de von KOCH et d'EHRENBAUM que nous avons donnés aux numéros 304 à 307. Ces procédés ont l'avantage de permettre de monter les coupes obtenues par usure, si elles sont très fragiles, sans éloigner la masse, qui est transparente et propre à conserver les coupes. Il n'y a qu'à chauffer doucement le porte-objet sur lequel la coupe est collée, ou bien à ajouter quelques gouttes de chloroforme, avant de poser le verre à couvrir.

NEALEY (*Amer. Mon. Mic. Journ.*, 1894, p, 142 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 348) recommande d'employer des portions d'os ou de dents *parfaitement fraîches*, et de les user sur un tour avec des meules d'émeri. De cette façon on peut préparer une dent en trente minutes, sans que la coupe soit devenue fragile ou ait acquis la

[1] Pour une revue critique très détaillée (40 pages, avec citation de 80 mémoires) de toute la technique du tissu osseux, voir SCHAFFER, « Die Methodik der histologischen Untersuchung des Knochengewebes », dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 167.

Digitized by Google

moindre tendance à s'enrouler. *Les parties molles n'étant pas éloignées* par ce procédé, on peut avec avantage soumettre les coupes à l'action des teintures, et obtenir des colorations nucléaires.

WHITE (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1891, p. 307) prend des coupes d'une épaisseur moyenne, faites par l'une ou l'autre des méthodes ci-dessus, et les met pour plusieurs jours dans une solution peu épaisse de collodion contenant de la fuchsine en solution, et après cela dans l'alcool pour durcir le collodion. On les réduit ensuite par usure à la finesse désirée, et on monte, en ayant soin d'en tenir la surface supérieure au sec, dans du baume dur. Les lacunes, les canaliculi et les tubuli de la dentine se montrent infiltrés, par le collodion coloré.

740. — VIVANTE (*Intern. Monatsschr.*, IX, 1892, p. 394; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 351) a trouvé que des portions minces d'os frais peuvent être imprégnées par le procédé au bichromate d'argent de GOLGI. Il prend des os frontaux de Veaux de quatre à six mois. Ces os n'ont pas plus de 3 à 4 mm. d'épaisseur. Il en met des morceaux pour huit jours dans la solution de Müller, puis dans le mélange osmique et le bain d'argent. Après imprégnation il faut décalcifier les pièces, ce qui se fait en les mettant pour vingt jours dans le mélange de von EBNER (solution de chlorure de sodium à 10 ou 15 p. 100 additionnée de 1 à 3 p. 100 d'acide chlorhydrique). Bien laver dans l'eau, traiter par une solution de carbonate de soude, et faire l'inclusion à la paraffine.

Autre méthode de VIVANTE. — Fixer les pièces pendant cinq à six jours dans le mélange de Flemming; laver, décalcifier dans le mélange de VON EBNER; laver, traiter par le carbonate de soude; enrober à la paraffine. Colorer les coupes pour une heure dans une solution de bleu de quinoléine à 0,2 p. 100. Laver à l'alcool à 50 p. 100; eau pure, sécher dans une étuve à 40° C. (il faut éviter l'alcool, et la glycérine aussi); essence de bergamote, damar. SCHAFFER (*loc. cit.*) dit qu'on obtient aussi de belles images en montant des coupes ainsi colorées dans l'acétate de potasse.

741. Os décalcifiés (FLEMMING, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 47). — Le procédé de la préparation par usure de coupes d'os non décalcifiés étant toujours délicat et souvent nécessairement très long, Flemming a imaginé une méthode très expéditive permettant de préparer des coupes d'os décalcifié démontrant les lacunes et les canalicules remplis d'air comme dans les coupes faites par usure sur l'os desséché. On fait au rasoir des coupes d'os décalcifié; on les imbibe d'eau on les porte dans l'eau sur une plaque de verre, et on les y étale; on enlève l'excès d'eau avec du papier buvard, on les recouvre d'une deuxième plaque de verre pour les empêcher de s'enrouler; on porte le tout dans une assiette et on verse de l'alcool dessus. Après une demi-heure, les coupes se trouvent fixées dans la position aplatie, et l'on peut les transporter dans un flacon d'alcool absolu où on peut

Digitized by Google

les conserver indéfiniment sans qu'elles s'enroulent. Pour les monter, on les lave à l'alcool frais, suivi, si l'on veut, d'éther ; on les étale de nouveau sur une plaque de verre, on les recouvre d'une double couche de papier buvard et d'une plaque de verre un peu pesante, et on les laisse sécher pendant un jour à l'air ou à la chaleur douce d'une étuve. Quand elles sont sèches, on les monte au baume chaud, de la manière suivante. On dépose une goutte de baume fondu sur un porte-objet, et on la laisse s'étaler, puis refroidir. On dépose et on laisse refroidir de même une goutte de baume sur le verre à couvrir. On pose la coupe à monter sur la couche de baume préparée sur le porte-objet, on la couvre du verre à couvrir préparé, on assujettit le verre à couvrir avec une petite pince, et l'on chauffe jusqu'à ce que le baume soit fondu. On obtient ainsi facilement des préparations dans lesquelles le système lacunaire, sans être entièrement injecté d'air dans toutes ses parties, offre cependant dans les endroits les plus réussis des images tout aussi instructives que celles des meilleures préparations faites par usure sur l'os desséché.

742. Coloration de l'os décalcifié et du cartilage. — Outre la *purpurine* et les autres colorants ordinaires qu'on trouvera indiqués dans le *Traité* de Ranvier, nous indiquons les suivants :

La *safranine* (Bouma, *Centralb. f. d. med. Wiss.*, 1883, p. 866). — Bouma emploie la safranine en solution aqueuse de 1/2000 ; il lave les coupes après coloration à l'eau pure ou acidulée. Le tissu osseux et conjonctif se colore en rouge, le cartilage en jaune par suite d'une combinaison chimique de la safranine avec la chondromucine.

Le *violet d'aniline* (Baumgarten, *Med. Centralb.*, 1876, p. 657 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 377). — Colorer des coupes pendant dix minutes.

Puis d'autres méthodes qu'on trouvera exposées avec le détail nécessaire par Schaffer, dans *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, 1, 1888, p. 1, et X, 2, 1893, p. 167-211.

743. Ligne d'ossification. Origine des corpuscules sanguins rouges (Bayerl, *Arch. f. mik. Anat.*, 1885, p. 35). — On prend des portions de cartilage en voie d'ossification et on les décalcifie dans un mélange à parties égales d'acide chlorhydrique à 1 p. 100 et d'acide chromique à 3 p. 100. On les lave à l'eau pendant plusieurs jours, on les déshydrate, on enrobe à la paraffine, et on débite en coupes. Puis on colore dans le mélange de carmin au borax

Digitized by Google

et de carmin d'indigo de Merkel (n° 234), et l'on monte au baume. La matrice du cartilage et celle du tissu osseux sont colorées en bleu, les cellules en rouge, et, ce qui est très important, les corpuscules sanguins rouges sont colorés en un vert pomme tout à fait caractéristique.

Max Flesch (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 351) recommande particulièrement ce procédé pour l'étude du développement des dents.

Moerner (*Skandinavisches Arch. f. Phys.*, I, 1889, p. 216 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, 4, 1889, p. 508) donne plusieurs méthodes pour la coloration du cartilage trachéal, surtout à titre de réactions microchimiques :

1° Colorations pour les trabécules (« Balkennetz »). (*a*) Coupes mises pour une demi-heure dans une solution aqueuse concentrée de Tropæoline OOO numéro 2 (de Schuchardt), et décolorées dans l'eau jusqu'à ce qu'il ne reste plus de coloré que les trabécules. (*b*) Colorer pendant quelques minutes dans une solution aqueuse concentrée de sulfindigotate de *potasse* (pas de *soude*) et décolorer comme ci-dessus ;

2° Colorations pour « Chondrinballen » (nids de cellules-cartilage) : (*a*) Colorer pendant une demi-minute à une minute dans une solution aqueuse de violet de méthyle à 0,15 p. 100, rincer à l'eau, et décolorer dans l'acide acétique à 10 p. 100 jusqu'à ce que les trabécules soient décolorées. Les « Chondrinballen » se montrent en bleu sur un fond incolore. (*b*) Colorer comme ci-dessus, mais avec du rouge d'aniline à 0,15 p. 100, et décolorer de même.

3° Méthodes combinées : (*a*) Colorer comme dans 1*a*, puis comme 2*a*, déshydrater rapidement, et éclaicir à l'essence de girofle. (*b*) Colorer comme 1*b*, puis comme 3*a*, mais en prenant le rouge d'aniline au lieu du violet de méthyle.

A consulter, une critique de ces méthodes par Wolters dans *Arch. f. mik. Anat.*, XXXVII, 1891, p. 492 (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 383), aussi la *Gewebelehre* de Schiefferdecker, p. 331.

Zschokke (*Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 3, 1893, p. 391) loue beaucoup (pour l'étude de la ligne d'ossification) la coloration par une solution aqueuse de benzoazurine. Le cartilage est incolore, le tissu conjonctif et les noyaux sont bleus, et les ostéoblastes rouges.

SANG

744. Introduction. — La technique de l'étude du sang est extrêmement compliquée. Le lecteur français possède déjà un traité des plus complets sur ce sujet, celui de Hayem, *Du sang et de ses altérations anatomiques*, Paris, Masson. Nous y renvoyons comme de juste le lecteur, qui désire faire une étude spéciale de ce tissu, et nous nous bornons à citer ici quelques procédés qui peuvent être utiles à l'étudiant qui ne vise pas à une étude spécialement approfondie.

745. Examen à l'état frais. — Le procédé vénérable qui con-

Digitized by Google

siste à étaler une goutte de sang sur une lamelle, à la fixer en passant la lamelle deux ou trois fois dans une flamme, et à examiner à l'*état sec*, donne lieu à des déformations sérieuses des éléments. Ce procédé demande en tout cas à être contrôlé par l'étude de portions de sang traitées à l'état frais par des réactifs fixateurs et étudiées à l'*état fluide*.

Méthode de Bizzozero et Torre (*Arch. per le sc. med.*, 1880, p. 390). — Faire dissoudre un peu de violet de méthyle dans la solution de sel de cuisine à 0,75 p. 100 et s'en servir comme liquide additionnel. Ce liquide conserve la forme des éléments, et colore les noyaux d'une manière intense.

Pour la coloration des *plaquettes* ou « *Blutplättchen* », Bizzozero (*Arch. f. path. Anat. u. Phys.*; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 389) emploie une solution de 1 partie de violet de méthyle pour 5000 parties de solution saline; ou bien une solution de violet de gentiane à 1/3000.

Toison (*Journ. sc. méd. de Lille*, fév. 1885; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 398) mélange du sang au liquide additionnel et colorant suivant :

Eau distillée	160 cc.
Glycérine neutre à 30°.	30 cc.
Sulfate de soude pur	8 gr.
Chlorure de sodium pur.	1 gr.
Violet de méthyle 5B	0 gr. 25

(Il faut faire dissoudre le violet dans la glycérine allongée d'une moitié de l'eau; faire dissoudre les deux sels dans l'autre moitié de l'eau; mêler les deux solutions, et filtrer à froid.) Les leucocytes sont colorés au bout de cinq à dix minutes; le maximum de coloration total est atteint au bout de vingt à trente minutes. On a pour résultat les leucocytes colorés en violet, les corpuscules rouges en verdâtre.

Liquide de Ferrier, ayant une densité égale à celle du plasma sanguin. Fuchsine, 1 gramme; eau, 150 cc.; alcool à 80 p. 100, 50 cc. faire dissoudre et ajouter 200 cc. de glycérine.

Préparation des « plaquettes » (Kemp, *Studies f. Biol. Lab. Johns Hopkins Univ.*, May 1886, III, n° 6; *Nature*, 1886, p. 132). — La simple démonstration des plaquettes est chose facile. Il n'y a qu'à déposer sur une lamelle mince une goutte un peu considérable de sang, la laver aussi rapidement que possible par un jet de solution saline normale et la porter aussitôt que possible sous le microscope; les plaquettes, qui ont la propriété de se coller au verre, seront res-

Digitized by Google

tées en place et seront visibles en grand nombre. Mais elles ne garderont pas longtemps leurs caractères naturels ; au bout de peu de temps elles se résoudront en des masses granuleuses amorphes. On peut cependant les conserver avec leurs caractères normaux moyennant une fixation appropriée, ce qu'on obtient en déposant sur le doigt, avant de le piquer, une goutte de solution d'acide osmique.

Pour la coloration de ces éléments, voyez plus haut le procédé de Bizzozero.

746. Fixation et conservation. — Les auteurs récents (Biondi, Mosso, Max Flesch et d'autres) s'accordent pour dire que le réactif le plus fidèle pour la fixation des corpuscules sanguins est l'acide osmique. Il convient de prendre une goutte ou deux de sang (d'après Biondi, ce doit être une goutte exactement), de mêler cette quantité à 5 cc. de solution d'acide osmique et de laisser reposer de une à vingt-quatre heures. La concentration de l'acide osmique doit varier selon les variétés de sang à étudier. En règle générale elle doit être forte, 1 à 2 p. 100 ; Biondi préfère celle de 2 p. 100. Les préparations peuvent être conservées dans une solution d'acétate de potasse (Max Flesch, *Zeit. f. wiss. Mik.*, V, I, 1888, p. 83).

Certains colorants, comme le vert de méthyle, le violet de méthyle, le krystallviolett, la safranine, l'éosine, la fuchsine acide, la rhodamine, l'iode, se laissent combiner à la solution d'acide osmique (Griesbach, *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 3, 1890, p. 328).

Les liquides mercuriques de Pacini sont bons, surtout les numéros 2 et 3.

Le liquide de Loewit (*Sitzb. k. Acad. Wiss. Wien*, XCV, 3, p. 129 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VI, I, 1889, p. 75) consiste en 5 cc. de solution saturée de sublimé, 5 grammes de sulfate de soude, 2 grammes de sel, et 300 cc. d'eau.

Liquide de Hayem. Sublimé corrosif 0,5 ; chlorure de sodium, 1 ; sulfate de soude, 5 ; eau, 200. Ajouter du sang à ce mélange en raison de 1 p. 100, laisser reposer quelques heures, décanter et colorer à l'éosine hématoxylique. Mosso trouve que l'un et l'autre de ces liquides sont trop faibles en sublimé. Liquides de Dekhuysen, voyez *Verh. d. Anat. Ges.*, 1892, p. 90, ou *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1893, p. 116.

747. Sang, coloration (Wissowzky, *Arch. f. mik. Anat.*, 1876, p. 479). — Wissowzky fait une solution d'éosine et d'alun par parties

Digitized by Google

égales dans 200 parties d'alcool. Si l'on traite du sang d'abord par l'eau et puis par la solution d'éosine, on trouve, après lavage par l'eau, que les corpuscules rouges ont pris une coloration rose dans toutes les parties desquelles l'hémoglobine n'a pas été extraite par l'eau. Les parties qui ne contiennent pas normalement d'hémoglobine, les noyaux par exemple, demeurent parfaitement incolores, et l'on peut les colorer par d'autres teintures, telles que l'hématoxyline. Les leucocytes ne se colorent point par l'éosine.

V. Thanhoffer (*Centralb. f. d. med. Wiss.*, 1877, p. 881) trouve que la réaction est bien plus marquée et plus permanente si l'on fixe préalablement les éléments du sang par de l'osmium à 1 p. 100 (quelques secondes ou quelques minutes). Gierke (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1884, p. 380) confirme ce résultat, et recommande le traitement pendant trois minutes par une solution d'osmium à 0,5 p. 100.

Moore (*The Microscope*, 1882, p. 73; *Journ. Roy. Mic. soc.*, 1882, p. 714). — Sécher rapidement du sang en couche mince sur un porte-objet. Colorer pendant trois minutes avec quelques gouttes de la teinture suivante :

Éosine	1	partie.
Eau	48	—
Alcool	48	—

(On fait dissoudre l'éosine dans l'eau et on ajoute l'alcool.)

On lave à l'eau et on colore pendant deux minutes avec quelques gouttes d'une solution aqueuse de vert de méthylaniline à 1 p. 100. On lave, on sèche et on monte au baume. Résultat : globules rouges, en rouge ; noyaux et leucocytes, en vert bleuâtre.

D'après Thin (*The Lancet*, July 6, 1895) une formule excellente serait celle de Chenzinsky, au bleu de méthylène et à l'éosine, que nous avons donnée au numéro 257. Ehrlich recommande de substituer la glycérine à l'eau dans ce mélange. Il vaut mieux colorer pendant au moins une demi-heure (Thin).

Il va sans dire que le mélange Ehrlich-Biondi-Heidenhain est tout spécialement indiqué pour des recherches sur le sang.

Pour le mélange carmin et carmin d'indigo de Merkel, voyez numéro 234.

Méthode de Weigert pour la coloration spécifique de la *fibrine* (*Fortschr. d. Med.*, V, 1887, n° 8, p. 228; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 4, 1887, p. 512). — Colorer des coupes dans une solution saturée de violet de gentiane ou de méthyle dans de l'eau anilinée. Sécher avec du papier buvard. Traiter par la solution de Lugol. Traiter

Digitized by Google

ensuite, directement, par l'huile d'aniline, qu'on renouvelle une ou deux fois. Xylol. Baume. Cf. numéro 613, le procédé de KROMAYER.

748. Sang. Autres méthodes. — BIONDI (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXI, 1888, p. 103 (*Journ. Roy. mic. Soc.*, 1888, p. 313, 659) donne une méthode pour l'étude du sang au moyen de coupes faites après inclusion d'une goutte de sang dans de l'agar-agar. SCHIEFFERDECKER (*Gewebelehre*, p. 389) dit qu'on peut aussi employer la celloïdine. Méthodes de FOÀ, *Festschr f. R.* VIRCHOW, 1891, p. 481 ; *Zeit. f. wiss. mik.*, IX, 2, 1892, p. 227. MÜLLER, *Sitzb. k. Acad. Wiss. Wien*, XCVIII, 3, p. 219 (*Zeit. f. wiss. mik.*, VII, 3, 1890, p. 326) (imprégnations au chlorure d'or par la méthode de Ranvier). LILIENFELD, *Arch. f. Anat. u. Phys.*, *Phys. Abth.*, 1892, p. 115 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 363 (méthodes de digestion pour l'étude des plaquettes); LAVDOWKSY, *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 1, 1893, p. 4 (fixation par l'acide iodique, à 2 p. 100).

GLANDES

749. Mucine. — FLEMMING (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 318) rappelle que l'hématoxyline est un réactif spécifique pour la mucine. Il recommande, pour la démonstration des glandes mucipares, de colorer les coupes d'abord par le procédé de Heidenhain, et ensuite par l'hématoxyline de Delafield ou de Bœhmer. Les cellules mucipares se colorent en violet.

HOYER (*Arch. f. mik. Anat.*, XXXVI, 1890, p. 310 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, I, 1891, p. 67) croit pouvoir formuler les conclusions suivantes. La mucine des cellules mucipares et des cellules caliciformes, tant des Vertébrés que des Invertébrés, se colore par les anilines basiques, mais pas par les anilines acides. L'hématoxyline alunée donne une réaction pareille à celle des anilines basiques, tandis que le carmin se comporte comme les anilines acides.

HOYER a obtenu ses meilleurs résultats avec la thionine (violet de Lauth). A défaut de cette couleur (qui ne se fabrique plus), il recommande l'améthyste (de Geigy et Cie, à Bâle), le bleu de toluidine, le bleu de phénylène d'Oehler à Offenbach, ou le bleu de phénylène-p de la fabrique de Höchst. Puis le bleu de méthylène ou le brun Bismarck. Hoyer colore ses coupes (de matériel au sublimé) pendant cinq à quinze minutes dans une solution aqueuse très diluée (deux gouttes de solution saturée pour 5 cc. d'eau).

Il est d'intérêt théorique d'observer que le cartilage hyalin, la gélatine de Wharton, et les Mastzellen d'Ehrlich donnent des réactions identiques à celles de la mucine.

Il est bon de savoir que toutes les marques de safranine ne donnent

Digitized by Google

pas la réaction ; celle de Bindschedler et Busch, à Bâle, la donne, tandis que la safranine O de Grübler ne la donne pas.

750. Cellules mucipares (SCHIEFFERDECKER, *Arch. f. mik. Anat.*, 1884, Hft 3). — Le réticulum spécial des cellules mucipares avait été découvert par Schiefferdecker (*loc. cit.*) à l'aide du vert d'aniline. Cette réaction a donné lieu à une longue polémique entre Schiefferdecker et List qu'on trouvera dans le *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 51, 222 et 223. D'après LIST (*loc. cit.*, p. 222), ces réticulums se colorent également d'une manière spécifique dans le vert de méthyle à 0,5 p. 100, dans le brun Bismarck de Weigert, dans le nitrate de rosaniline, et dans les teintures doubles de List (n° 258). Schiefferdecker (*loc. cit.*, p. 224) maintient que les réticulums colorés par les réactifs de List ne sont pas identiques à celui qu'il a démontré avec son vert d'aniline. Nous renvoyons le lecteur qui désire se former une opinion sur cette question à l'étude des mémoires que nous citons et des objets dont ils traitent.

751. Cellules caliciformes (FLEMMING, *loc. cit.*, p. 519). — Flemming fait observer que le contenu de l'épithélium de l'intestin et d'autres organes prend, après fixation par l'osmium ou un mélange osmique et coloration par l'hématoxyline, une coloration spécifique en bleu foncé ou en violet. Le traitement de préparations ainsi fixées par la safranine ou le violet de gentiane en teinture régressive produit une réaction analogue et peut-être encore plus démonstrative.

PAULSEN (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 520) confirme les résultats de Flemming, et fait observer qu'en employant une forte coloration par l'hématoxyline de Delafield (un quart d'heure dans la solution concentrée, ou douze à quinze heures dans une solution étendue), on obtient, outre la coloration des noyaux, une coloration spécifique du réticulum lâche spécial des cellules mucipares et des cellules caliciformes.

Réaction à l'acide perruthénique de RANVIER, *Comptes rend.*, 1887, 3, p. 145.

Pour des instructions détaillées pour l'étude de cellules caliciformes, voir LIST, *Arch. f. mik. Anat.*, XXVII, 1886, p. 481.

752. Foie. — Consulter les importants mémoires de RANVIER, *Les membranes muqueuses et le système glandulaire* dans le *Journ. de Microgr.* de 1885-6 ; IGACUSCHI, dans *Arch. f. path. Anat.*, XCVII, p. 142, ou *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 243 ; KUPFFER, *ibid.*, VI, 1889,

Digitized by Google

p. 506 ; OPPEL, *Anat. Anz.*, V, 1890, p. 143, et VI, 1891, p. 165 ; BERKLEY, *ibid.*, VIII, 1893, p. 772.

753. Autres méthodes pour organes glandulaires. — LIST, *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 514. — RANVIER, *Le mécanisme de la sécrétion*, dans *Journ. de Microgr.*, 1886-7. — HEIDENHAIN, de nombreux mémoires dans l'*Archiv* de Pflüger

Digitized by Google

CHAPITRE XXXIII

QUELQUES MÉTHODES ZOOLOGIQUES

754. Introduction. — Nous n'avons nullement l'intention, dans ce chapitre, de passer en revue la technique histologique dans son application aux divers groupes du règne animal, d'une manière systématique. Nous ne ferons que signaler les variantes des procédés usuels qui sont indiquées pour certains cas plutôt spéciaux, lesquels peuvent facilement embarrasser si l'on n'est pas guidé pour les aborder.

Nous nous bornons, en général, à la technique *histologique*, laissant de côté pour la plupart tout ce qui regarde uniquement la préparation de grosses pièces pour les collections[1] ou les dissections macroscopiques.

Ce sujet, on le trouvera admirablement traité dans une exposition détaillée des méthodes employées à la Station Zoologique de Naples, par SALVATORE LO BIANCO (*Mitth. zool. Stat. Neapel*, IX, 1890, p. 435). J'ai essayé bon nombre des procédés de LO BIANCO, et ils m'ont toujours donné d'excellents résultats.

Depuis quelque temps la préparation des pièces pour les musées a été singulièrement facilitée par l'introduction du *formol* comme milieu conservateur au lieu d'alcool. Je regarde comme établi que c'est là un liquide conservateur admirable, et le plus souvent beaucoup plus facile à manier que l'alcool. Je dis liquide *conservateur* et non liquide *fixateur*. M. le docteur WEBER, qui a eu une expérience étendue du formol pour la conservation des collections de Villefranche, et qui m'a montré des pièces délicates admirablement conservées, m'a dit qu'il

[1] J'ai cependant cru utile d'indiquer quelques méthodes, tirées de ma propre expérience, pour la fixation en extension d'organismes souvent assez volumineux, méthodes qui sont bonnes en même temps pour l'étude histologique des organes.

Digitized by Google

est rarement possible d'avoir de bons résultats avec les animaux marins en employant le formol *comme fixateur*. Il faut commencer par les fixateurs ordinaires, et se servir ensuite du formol pour les lavages et la conservation.

TUNICIERS

755. Tuniciers. — Préparation en général très facile. Pour les Appendiculariés et les petits Thaliacés nous ne voyons rien de mieux que de fixer par le sublimé acidulé par l'acide acétique : on pourra colorer comme on voudra. Les grandes Salpes se fixeront cependant souvent mieux par l'acide osmique ou un mélange chromique, ou un mélange chromo-osmique. Les Ascidies, surtout les formes composées à zooïdes rétractiles, offrent plus de difficulté. Nous avons donné, au numéro 26, le procédé de Salvatore Lo Bianco pour tuer les Ascidies avec leurs orifices ouverts. Il recommande ce procédé pour *Ciona*, *Ascidia*, et *Rhopalea*. Mais d'autres formes, telles que *Clavellina*, *Perophora*, *Phallusia*, *Molgula*, *Cynthia*, etc., demanderont une narcotisation préalable par l'hydrate de chloral (0,1 p. 100 dans l'eau de mer), et doivent être fixées ensuite dans l'acide acétique additionné de un dixième d'acide chromique à 1 p. 100, suivi d'acide chromique à 1 p. 100.

Les Ascidies composées à zooïdes contractiles sont un sujet qui demande absolument à être traité de la bonne manière. Voici un procédé dû à van Beneden pour fixer les zooïdes d'*Amaræcium*, de *Pyrosoma*, etc., dans leur état épanoui normal (nous ne savons si ce procédé a été publié ailleurs : c'est à l'obligeance de M. C. Maurice que nous en devons la communication). On place les cormes dans de l'eau de mer bien propre, et on laisse reposer quelques heures pour que les animaux s'étalent. On saisit alors brusquement les cormes et on les plonge aussi rapidement que possible dans de l'acide acétique cristallisable. On les laisse dans l'acide deux, quatre ou six minutes, selon les dimensions des cormes. Puis on les lave longuement par l'alcool, d'abord à 50°, puis graduellement plus fort, et souvent renouvelé. Il faut avoir soin de ne pas se servir d'instruments d'acier pour sortir les animaux de l'acide, car le contact de l'acier donne lieu à des taches noires. On peut se servir de ses doigts, en ayant soin de les laver aussitôt après. Nous avons trouvé que par ce moyen on obtient des animaux en général parfaitement fixés dans l'attitude étalée normale ; cette méthode a aussi l'avantage de ne causer aucune opacité ni dans le manteau ni dans les tissus.

Digitized by Google

MOLLUSCOÏDA

756. Bryozoaires. — Pour quelques méthodes d'extension et de fixation, voyez les numéros 15, 21, 23. S. Lo Bianco se sert pour *Pedicellina* et *Loxosoma* du procédé au chloral, et fixe au sublimé. Pour *Flustra*, *Cellepora*, *Bugula*, *Zoobothrium*, il se sert du procédé à l'alcool d'Eisig, numéro 19.

Pour *Cristatella*, Cori (*Zeit. f. wiss. Zool.*, LV, 1893, p. 626) préfère un mélange de 1 volume d'alcool méthylique avec 2 volumes de solution physiologique de sel et une goutte de chloroforme. Le chloral macère.

MOLLUSQUES

757. Fixation des Mollusques. — Il y a deux groupes de Mollusques dont les espèces peuvent offrir quelques difficultés à l'égard de la fixation ; ce sont les Lamellibranches et les Gastéropodes.

Les Lamellibranches, lorsqu'on les sort de l'eau pour les plonger dans un liquide fixateur, retirent leurs siphons et leur pied, ferment leurs valves et meurent en état de contraction. Si ensuite on emploie la force pour ouvrir la coquille, on risque de déchirer le manteau et l'on trouve qu'il est à peu près impossible de faire étaler le pied et les siphons. De Castellarnau (*La Estacion Zoologica de Napoles*, etc., Madrid, 1885) recommande de les faire mourir par la méthode d'Eisig en ajoutant goutte à goutte, à la surface de l'eau où ils se trouvent, soit de l'alcool, soit le mélange d'alcool, glycérine et eau de mer de Salvatore Lo Bianco dont nous avons donné la composition au numéro 19. Il faut avoir soin d'ajouter l'alcool ou le mélange très graduellement, en versant très peu à la fois, et de ne pas agiter l'eau où les animaux se trouvent ; car il est nécessaire que la diffusion de l'alcool s'opère avec une grande lenteur. L'opération peut durer plusieurs heures, mais on obtient de bons résultats. Les animaux, avant de mourir, entrent dans un état de stupeur qui leur ôte la faculté de se contracter ; ils étendent, au contraire, largement leur pied, leurs siphons, leurs branchies et leurs tentacules, et meurent avec la coquille ouverte. Du reste, une fois l'insensibilité établie, on peut les tuer dans la position étalée en les jetant dans l'acide picrosulfurique ou un autre fixateur rapide.

Les mêmes procédés donnent quelquefois de bons résultats pour

Digitized by Google

es Gastéropodes. Nous avons indiqué, au numéro 27, la manière de faire mourir les Pulmonés dans l'eau privée d'air.

La quantité énorme de mucus qui existe dans les couches tégumentaires des Gastéropodes est souvent un obstacle à la préparation. Pour se débarrasser de cette substance on pourra, dans certains cas, suivre les indications de v. Marchi (*Arch. f. mik. Anat.*, 1867, p. 204), qui a trouvé que si l'on jette une *Limax* vivante dans de la solution de sel, d'une concentration moyenne, l'animal se débarrassera de quantités énormes de mucus, et mourra en quelques heures.

758. Injection des Acéphales (Flemming, *Arch. f. mik. Anat.*, 1878, p. 252). — Pour tuer les animaux, il faut les faire geler dans un mélange de glace et de sel de cuisine et les mettre pendant une demi-heure dans de l'eau tiède. Au bout de ce temps, on les trouvera morts, et dans un état propre à l'injection. Le traitement par le chloroforme ou l'éther ne donne pas de bons résultats. On peut attacher la canule dans le cœur; mais il reste toujours la difficulté de fermer les vaisseaux qu'on peut avoir coupés et qu'il est impossible de lier. A cette fin, après avoir posé et lié la canule dans le cœur, on remplit et on couvre tout l'animal de plâtre. Aussitôt que le plâtre est pris, on peut pousser l'injection.

759. Yeux de Gastéropodes (Flemming, *Arch. f. mik. Anat.*, 1870, p. 441). — Le problème est ici d'obtenir l'exsertion de l'œil, car il est impossible d'enlever le pédoncule sur un animal vivant sans qu'il se rétracte au moins en partie. Il faut enlever le pédoncule par un coup de ciseaux rapide, donné près de la base; ne pas s'inquiéter de l'invagination de l'œil qui aura certainement lieu, mais jeter le tout dans de l'acide chromique dilué, ou dans du bichromate de potasse à 4 p. 100; après quelque temps le pédoncule s'étendra et l'œil restera évaginé dans la position normale. On peut alors durcir dans le bichromate, l'acide osmique à 1 p. 100, ou l'alcool. Carrière (*Zool. Anzeig.*, 1886, p. 231) procède comme suit : Enlever l'œil avec le bout du tentacule, et fixer en l'exposant pendant quelques minutes aux vapeurs d'osmium. Faire des coupes selon les procédés connus. Les coller sur le porte-objet avec le collodion de Schællibaum. Les colorer par le picro-carmin; ou bien les dépigmenter en les traitant très soigneusement par l'eau de Javelle *très diluée*, puis colorer au picro-carmin. Carrière n'a pu réussir la dépigmentation que chez l'*Helix pomatia;* il a échoué chez les Prosobranches. Lorsque l'opération est bien réussie, les tissus se montrent parfaitement conservés. Monter au damar.

Digitized by Google

760. Yeux des Chitonides (MOSELEY, *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1885, p. 40). — Moseley employait principalement des coupes à travers des coquilles décalcifiées. Après avoir essayé bon nombre des méthodes préconisées de décalcification lente, il est arrivé à ce résultat que, sous tous les rapports, la décalcification rapide par l'acide nitrique est à préférer. Il place les fragments de coquille, dont les tissus ont été d'abord durcis dans l'acool fort, dans 100 à 200 cc. d'eau distillée, et il ajoute goutte à goutte de l'acide nitrique concentré jusqu'à ce qu'il se produise un dégagement énergique de gaz, ce qui arrive en général lorsqu'on a ajouté à l'eau 3 à 4 p. 100 d'acide. Si la décalcification n'est pas complète au bout de douze heures, on transporte les objets dans une nouvelle quantité d'eau distillée, et l'on recommence la décalcification.

761. Yeux de PECTEN, etc., voir PATTEN, *Mitth. Zool. Stat. Neapel.*, VI, 4, 1886, p. 733.

762. Yeux des Céphalopodes (GRENACHER, *Abhandl. d. naturf. Ges. Halle a. S.*, XVI ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 244). — Fixer dans l'acide picro-sulfurique ; ou dans une solution saturée de sublimé dans l'acide picro-sulfurique ; ce dernier réactif se montre surtout utile pour *Octopus*, *Eledone*, et *Sepia*, mais ne réussit pas avec les formes pélagiques (*Loligo*, *Ommatostrephes*, *Rossia*). Dépigmentation par l'acide chlorhydrique, au lieu de l'acide nitrique dont Grenacher s'était servi dans ses recherches antérieures. Il recommande aussi le mélange numéro 547. On peut aussi combiner la dépigmentation avec la coloration au carmin ; on colore par le carmin boracique et on décolore dans le mélange cité ; le pigment est enlevé à la décoloration plus rapidement que le carmin. Mais ce procédé demande plus d'habitude. On peut entreprendre la dépigmentation sur des coupes, mais il vaut mieux la faire sur des fragments de rétine de 2 à 5 millimètres d'épaisseur. Monter les préparations dans l'huile de ricin (voyez n° 407).

Pour les yeux d'**Hétéropodes**, GRENACHER emploie des méthodes semblables.

763. Epithélium cilié (ENGELMANN, *Pflüger's Arch.*, 1880, p. 505 et suiv.). — Intestin de *Cyclas cornea*. Macération dans l'acide osmique à 0,2 p. 100 (après avoir chauffé l'animal pendant quelque temps à 45 ou 50° C.), ou bien macération dans l'acide borique concentré. Pour démontrer la couche bacillaire, faire macérer dans l'al-

Digitized by Google

cool au tiers, dans le liquide de Müller, l'acide borique ou l'acide salicylique. Les prolongements intra-cellulaires des cils peuvent être isolés, par la dissociation avec des aiguilles, de l'épithélium frais de l'intestin d'un Lamellibranche (Anodonte, par exemple) dans du bichromate de potasse à 4 p. 100 ou dans la solution de sel de cuisine à 10 p. 100. Pour obtenir de bonnes images de cet appareil *in situ* dans le corps des cellules, faire macérer pendant pas plus d'une heure dans une solution concentrée d'acide borique ou salicylique. On peut aussi employer l'acide osmique très dilué, par exemple à 0,1 p. 100. Les cellules latérales des branchies se laissent traiter facilement par une solution saturée d'acide borique allongée d'un cinquième d'eau.

Engelmann recommande beaucoup pour ces recherches, qui sont extrêmement délicates, l'éclairage par la lumière verte, qui est plus favorable à la définition microscopique que la lumière ordinaire (voyez Lamansky; *Arch. f. Ophthalm.*, 1871, p. 123).

Nous ne saurions trop recommander l'étude de ce mémoire d'Engelmann, qui est un modèle de technique intelligente et ingénieuse.

Mélange macérateur de Brock, numéro 508.

Mélange de Möbius, numéro 509.

Mélange de Béla Haller, numéro 513.

Patten (*Mitth. zool. Stat. Neapel*) loue beaucoup pour les macérations une solution de 40 gouttes d'acide sulfurique dans 50 gouttes d'eau.

764. Coquille. — On peut étudier des tranches minces de coquille non décalcifiée, obtenues par les méthodes d'usure connues, ou, ce qui vaudra souvent mieux, par la méthode à la colophane de Ehrenbaum, que nous avons décrite au numéro 306. Pour les coupes de coquille décalcifiée, Moseley, qui a eu beaucoup d'expérience de ce genre de travaux, recommande avant tout le procédé de décalcification que nous avons décrit plus haut (n° 760).

ARTHROPODES

765. Méthodes normales pour les Arthropodes. — D'après notre expérience, nous sommes conduit à admettre que les méthodes recommandées par Paul Mayer méritent la préférence sur toutes les autres comme méthodes normales pour l'étude des Arthropodes et de tous les organismes chitineux. Il est absolument nécessaire pour

Digitized by Google

ces sortes d'objets de faire usage, dans toutes les opérations de fixation, de coloration et de lavage, de réactifs ayant la plus grande puissance de pénétration qu'il soit possible d'obtenir. Nous recommandons donc de fixer en général avec l'acide picro-sulfurique (*concentré*) à moins qu'il n'y ait des raisons spéciales pour préférer l'acide picronitrique ou l'acide picro-chlorhydrique; de laver par l'alcool à 70° ou plus fort, jamais plus faible; et de colorer par une teinture *alcoolique :* Paracarmin, teinture de cochenille (l'ancienne formule étant souvent à préférer), carmin alcoolique à l'acide chlorhydrique, hæmacalcium.

Certaines formes peuvent bien se fixer par le sublimé. Ce réactif peut, par exemple, être souvent employé avec avantage pour des Copépodes, pour des larves de Décapodes, etc. Quelques Copépodes cependant (*Copilia*, *Sapphirina*) se laissent beaucoup mieux conserver par l'acide osmique (faible); et il en est de même pour les Ostracodes. Dans bien des cas, le traitement par l'acide osmique fournit une différenciation suffisante des éléments des tissus, de sorte qu'il n'est pas nécessaire de recourir à une coloration ultérieure (*Copilia*, *Phyllosoma*).

Rappelons qu'il est souvent avantageux et même nécessaire d'employer les réactifs à chaud, surtout les liquides de fixation et de lavage.

766. Méthodes pour rendre la chitine transparente et perméable (Looss). — Nous avons donné cette méthode au numéro 328.

List (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 212) a obtenu de bons résultats avec des Coccides en traitant les animaux (après durcissement) pendant dix-huit à vingt-quatre heures par l'eau de Javelle allongée de 4 volumes d'eau. Après lavage, on peut passer par l'alcool à la paraffine. La chitine est suffisamment ramollie pour permettre de faire de bonnes coupes. On peut colorer en masse avant l'inclusion, si on le désire.

Méthode de Sazepin, pour les antennes des Chilognathes (*Mém. Acad. Imp. Sc. St-Pétersbourg*, LXXXII, n° 9, 1884, p. 11-12). — La forte pigmentation de la chitine de ces organes est un grand obstacle à la préparation. Ni la potasse ni l'acide nitrique concentré ne peuvent servir pour l'éloigner. Sazepin prend des antennes déshydratées par l'alcool, et les met dans du chloroforme. La réaction est très lente, la chitine devient moins opaque, mais le pigment ne disparaît pas entièrement. Pour en éloigner les dernières traces, il suf-

Digitized by Google

fit d'ajouter alors au chloroforme une goutte d'acide nitrique fumant, qui les fait entièrement disparaître. Employé de cette manière, l'acide nitrique n'exerce pas d'action nuisible sur les tissus. Il faut agiter de temps à autre le mélange, pour empêcher l'acide de nager à la surface du chloroforme. Il faut vingt-quatre heures pour compléter la réaction.

767. Yeux de Limule (Lankester et Bourne, *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1883, p. 180). — Alcool; térébenthine; paraffine; coupes. Dépigmenter les coupes soigneusement, sous le microscope, par l'acide nitrique de 5 à 10 p. 100. Les monter au baume, les unes après coloration par le carmin boracique, les autres sans coloration. Monter aussi de la même manière des coupes non dépigmentées.

768. Yeux de Mouche et d'autres Arthropodes (Hickson, *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1885, p. 243). — Exposer le crâne, après en avoir enlevé la paroi postérieure, aux vapeurs d'osmium pendant quarante minutes. Laver pendant quelques minutes dans l'alcool à 60°. Durcir dans l'alcool absolu. Faire des coupes. En dépigmenter un certain nombre de la manière suivante : Les coupes sont fixées sur le porte-objet par l'albumine de Mayer; la paraffine est éloignée par de l'essence de térébenthine, celle-ci est éloignée par de l'alcool absolu, et le porte-objet est renversé au-dessus d'une capsule contenant de l'alcool à 90° auquel on a ajouté quelques gouttes d'acide nitrique fort. Il se produit des vapeurs nitreuses abondantes, et le pigment se dissout. On peut arrêter la réaction au moment voulu en lavant dans l'alcool pur.

Pour les dissociations, mettre l'œil ou le nerf optique pendant vingt-quatre heures dans une solution d'hydrate de chloral à 5 p. 100, dissocier avec des aiguilles, et monter à la glycérine. Si l'on fixe les tissus dissociés sur le porte-objet par l'albumine de Mayer, on peut les laver à l'alcool et les colorer en place; on peut aussi les dépigmenter avant de les décolorer. Voyez aussi les numéros 542 à 550.

769. Yeux de Scorpion. — Parker (*Bull. Mus. Comp. Zool.*, Cambridge, 1889, p. 173) dit que pour des yeux de Scorpion les solutions usuelles d'acide nitrique à 5 ou 10 p. 100 ne sont pas assez fortes. Il traite des coupes, collées sur un porte-objet au collodion de Schällibaum, pendant une minute par une solution d'acide nitrique de 50 p. 100 dans l'alcool; ou mieux, par une solution à 35 p. 100 d'un mélange d'acide nitrique et d'acide chlorhydrique à

Digitized by Google

parties égales dans l'alcool. (Pour faire ces solutions, il faut ajouter l'acide lentement à l'alcool (et non le contraire) et refroidir le mélange avant de s'en servir.)

Pour les méthodes du même auteur pour les yeux de *Homarus*, voir *op. cit.*, XX, 1890, p. 1.

Cf. aussi les méthodes de VIALLANES, *Ann. d. Sci. Nat.*, XIII, 1892, p. 354.

770. Collines de Doyère des Tardigrades (DOYÈRE, *Arch. f. mik. Anat.*, 1865, p. 105). — On prend une vingtaine d'individus de *Milnesium tardigradum* (il est bon d'en prendre un certain nombre, car l'expérience ne réussit pas avec tous les individus); on les met dans une éprouvette contenant de l'eau qui a été privée de son air par l'ébullition. On coule à la surface de l'eau une goutte d'huile, de manière à empêcher le contact de l'air extérieur. Au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures on trouvera les animaux immobilisés dans un état cataleptique ; la circulation aura cessé, le pigment de la cuticule aura disparu ou sera ramassé en des plaques qui ne gênent pas l'observation ; tout l'animal sera devenu plus transparent, les nerfs et les muscles se dessineront avec une netteté remarquable. On étudie les animaux dans l'eau qui a été bouillie ; à moins qu'on ne désire étudier les phénomènes de la reviviscence, auquel cas on prend de l'eau de source.

771. Phalangides (RŒSSLER, *Zeit. f. wiss. Zool.*, 1882, p. 672). — Tuer les animanx dans l'eau bouillante; il faut laisser donner plusieurs bouillons à l'eau pour bien coaguler l'albumine des tissus; les passer par l'alcool à 70°, puis à 90°, puis absolu. Inclure par infiltration dans du savon (la préparation de la masse n'est pas indiquée ; voyez n°s 277 à 280). Colorer les coupes sur porte-objet avec une teinture alcoolique.

Rœssler avait essayé l'inclusion à la paraffine, qui lui avait donné de mauvais résultats à cause de la fragilité des tissus produite par la pénétration par l'essence de térébenthine ou de girofle. Nous pensons que l'essence de bois de cèdre donnerait peut-être de meilleurs résultats.

772. Macrotoma plumbea (SOMMER, *Inaug. Diss.*, 1884, p. 4 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 234). — Fixer par l'eau bouillante d'après la méthode de Rœssler pour les Phalangides (n° 771), et durcir pendant plusieurs heures dans l'acide picro-sulfurique allongé de

Digitized by Google

5 volumes d'eau. Passer par l'alcool ; colorer par le carmin aluné, ou le carmin-borax. Coupes à la paraffine, après pénétration par le chloroforme.

VERS

773. Turbellariés (Lang, *Zool. Anzeig.*, 1878, p. 14 ; 1879, p. 45, 46; *Die Polykladen*, etc., *Fauna u. Flora d. Golfes v. Neapel*, 1884, p. 30). — L'observation des animaux vivants ne peut guère suffire que pour l'étude des systèmes vasculaires, pour laquelle elle est indispensable, aucune méthode n'ayant été découverte jusqu'ici qui permette d'étudier l'appareil aquifère sur des pièces conservées.

Pour la fixation, Lang emploie presque toujours soit le sublimé pur, soit le liquide numéro 67 ou le liquide numéro 63. Il est souvent nécessaire d'employer ces liquides à chaud, même bouillants ; on les emploie de la manière indiquée au numéro 63. Dans ces derniers temps, Lang a trouvé qu'on peut obtenir des résultats assez satisfaisants par l'alcool employé à chaud.

Pour les **Rhabdocœles** Braun (*Zeit. f. wiss. Mik.*, III, 1886, p. 398) procède comme suit. — On met un animal sur une lamelle porte-objet, on l'aplatit légèrement au moyen d'un verre à couvrir, et on le tue en introduisant entre les deux verres un mélange de trois parties de liquide de Lang avec une partie de solution d'acide osmique à 1 p. 100. D'autres agents fixateurs ne lui ont pas donné de bons résultats. Coupes à la paraffine.

Pour les **Rhabdocœles acœles** Delage (*Arch. de Zool. expér.*, t. IV, sér. 2, 1886 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 239) recommande beaucoup la fixation par un mélange d'acide osmique et de carmin ammoniacal. Un autre fixateur excellent est la solution concentrée de sulfate de fer. Les animaux (*Convoluta*) y meurent parfaitement étendus. Le liquide de Lang ne réussit pas, dit-il.

Pour la coloration, Delage recommande l'acide osmique carminé, ou bien l'imprégnation par l'or. — (Acide formique au tiers, deux minutes ; chlorure d'or à 1 p. 100, dix minutes ; acide formique à 2 p. 100, deux à trois jours dans l'obscurité. — Il est bon de laisser produire une réduction excessive et de décolorer par une solution de cyanure de potassium à 1 p. 100.)

von Graff (*Die Organisation d. Turbellaria Acœla*, Leipsig, 1891 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 1, 1892, p. 76) fait les remarques suivantes. — Le mélange de Flemming, suivi d'hématoxyline, donne une bonne

Digitized by Google

conservation des téguments ; mais même cette méthode ne fournit pas une conservation satisfaisante des rhabdites, qui chez les Acœles et les Alloiocœles paraissent se gonfler jusqu'à être détruits, tandis que chez les Planaires terrestres, chez les Polyclades et la plupart des Rhabdocœles ils se conservent mieux. La même méthode convient pour le parenchyme d'*Amphichœrus cinereus*, *Convoluta paradoxa*, et *C. sordida*. Le sublimé ne convient pas pour ces espèces, mais donne de bons résultats pour *Convoluta Roscoffensis*. Le système nerveux peut être étudié par les méthodes de Delage. Pour les Dendrocœles d'eau douce. Chichkoff (*Arch. de Biol.*, XII, 1892, p. 438) recommande le mélange suivant : sublimé à 2 p. 100, 6 parties ; acide acétique à 15 p. 100, 4 parties ; acide nitrique, 2 parties ; chlorure de sodium à 14 p. 100, 8 parties ; alun à 2 p. 100, 1 partie.

774. Némertiens. — Les Némertiens sont extrêmement difficiles à fixer. Après une assez longue expérience de ce groupe, nous devons dire que nous n'avons pu trouver aucune méthode qui mène sûrement au but. Nous avons toujours obtenu nos meilleurs résultats en fixant par le sublimé (sol. sat. à froid, avec 1 p. 100 d'acide acétique). Il est bon de couper d'abord la tête de l'animal, et de projeter les morceaux à fixer, qui ne doivent pas être trop longs, aussi rapidement que possible dans la solution de sublimé ; c'est un tour de main à apprendre, et qui ne réussit pas toujours. Nous décapitons les animaux, parce que nous avons observé que les contractions sont beaucoup moins énergiques dans les tronçons qui ne sont plus en communication avec les ganglions cérébraux. Nous avons essayé la plupart des fixateurs énergiques, liquides osmiques, chromiques, etc., et nous ne les recommandons pas ; les liquides chromiques et le perchlorure de fer nous paraissent être surtout à éviter, car ils semblent agir comme des irritants, et provoquer des contractions musculaires d'une violence telle que les tissus en souffrent ; les animaux y meurent aussi beaucoup moins vite que dans le sublimé.

De Castellarnau (*La Estacion Zool. de Napoles*, p. 137) dit qu'on peut tuer les Némertiens par la méthode d'Eisig, pour narcotiser graduellement par l'alcool, méthode que nous avons décrite plus haut à propos des Mollusques (n° 757). Nous n'avons pas eu l'idée d'essayer cette méthode. Nous avons essayé le procédé de Foettinger à l'hydrate de chloral (n° 21), les espèces sur lesquelles nous avons expérimenté mouraient bien plus ou moins étendues, mais crachaient toujours leur trompe.

Digitized by Google

S. Lo Bianco cependant réussit avec une solution à 0,1 à 0,2 p. 100 dans l'eau de mer.

M. le professeur du Plessis nous a indiqué l'eau douce chaude, même presque bouillante, comme étant dans bien des cas le meilleur moyen de tuer les Némertiens. Elle conserve assez bien les tissus.

Les colorations « vitales » au bleu de méthylène pourront avoir une certaine utilité à l'occasion. Pour l'application de la méthode au bleu de méthylène à l'étude du système nerveux, voir Brüger, *Mitth. zool. Stat. Neapel*, X, 1891, p. 206 (résultats pas très satisfaisants).

Pour les colorations de pièces fixées, nous pensons qu'il est absolument obligatoire de n'employer que des teintures alcooliques, car les espèces même les plus délicates ne se laissent pénétrer en aucun laps de temps raisonnable par les teintures aqueuses. Nous employons le carmin au borax, ou le carmin alcoolique de Mayer. L'hématoxyline et la cochenille de Mayer donnent en général de moins bonnes préparations, à cause de l'énergie avec laquelle elles se portent sur la mucine qui, en général, existe en si grande abondance dans la peau des Némertiens.

Les coupes se font très bien à la paraffine pour les espèces petites et moyennes, si l'on a soin de faire la *pénétration par l'essence de bois de cèdre* (le chloroforme se refuse souvent à pénétrer ces objets même après des semaines).

775. Cestodes. — A étudier par les méthodes ordinaires des coupes. Nous rappelons que l'observation de l'animal vivant (Vogt et Yung, *Trait. d'Anat. Comp. prat.*, p. 204) peut rendre des services, surtout pour l'étude du système excrétoire. Comme l'a montré Pintner, on peut conserver des Ténias en vie pendant plusieurs jours dans de l'eau additionnée d'un peu de blanc d'œuf. Lönnberg (*Centralb. f. Bakt.*, 1892, p. 89 ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1892, p. 281) a gardé le *Triænophorus nodulosus*, parasite du Brochet, en vie pendant un mois dans une solution de peptone pepsiné, contenant de 3 à 4 p. 100 de substance nutritive et moins de 1 p. 100 de NaCl (réaction faiblement acide).

776. Trématodes (Fischer, *Zeit. f. wiss. Zool.*, 1884, p. 1). — L'*Opisthotrema cochleare* peut être monté *in toto* dans le baume, après traitement par l'alcool absolu, le picro-carmin ou l'hématoxyline ou le carmin ammoniacal, et l'essence de girofle.

Pour les coupes, Fischer recommande une masse d'inclusion faite en dissolvant 15 parties de savon dans 17,5 parties d'alcool à 96°.

Digitized by Google

Cette masse fond à 60° C. environ, pénètre très rapidement, et se solidifie en quelques minutes. On étudie les coupes dans la glycérine.

SCHWARZE (*Zeit. f. wiss. Zool.*, 1885 p. 45) a trouvé que le seul moyen de conserver les tissus des *Cercaires* est de fixer dans une solution saturée de sublimé, chauffée à 35 ou 40° C.

WRIGHT et MACALLUM (*Journ. of Morphol.*, 1, 1887, p. 1) ont trouvé que *Sphyranura* se fixe bien dans le mélange de Flemming, et se colore bien dans la cochenille alunée.

777. Nématodes (LOOSS, *Zool. Anzeig.*, 1885, p. 333). — La cuticule extrêmement résistante des Nématodes oppose souvent un très grand obstacle à la pénétration des réactifs. Selon Loos, on peut vaincre cet obstacle en traitant les animaux (ou leurs œufs, qui présentent la même imperméabilité) par l'eau de Javelle ou l'eau de Labarraque, selon la manière que nous avons décrite au n° 528.

BRAUN (*Die thier. Parasiten d. Menschen*, etc. ; *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1885, p. 897). — Braun recommande de monter des préparations non colorées de petits Nématodes dans le milieu suivant : — Gélatine, 20 parties ; glycérine, 100 parties ; eau, 120 parties ; acide phénique, 2 parties. On fait fondre ce mélange au moment de s'en servir. Le baume aurait quelquefois l'effet curieux de rendre les Nématodes opaques. D'après ZUR STRASSEN (*Zeit. f. wiss. Zool.*, LIV, p. 655), le *Bradynema rigidum* de l'*Aphodius fimetarius* doit être fixé pendant douze heures au moins dans le mélange de Flemming.

778. Acanthocéphales (Echinorhynques) (SAEFFTIGEN, *Morphol. Jahrb.*, 1884, p. 121). — La meilleure manière de tuer les animaux est de les mettre dans l'acide osmique à 0,1 p. 100 environ ; ils y vivent longtemps : ils se contractent pendant les premières heures, mais s'étendent complètement avant de mourir. On peut aussi employer l'acide chromique à 0,1 p. 100 ; les animaux y vivent plusieurs jours, mais meurent à la fin parfaitement étendus. C'est ce réactif qui vaut le mieux pour l'étude de la sous-cuticule. Les méthodes de la fumée de tabac et du chloroforme, et les fixateurs qui tuent rapidement, comme le sublimé ou les solutions fortes d'acide osmique, donnent des résultats inférieurs à ceux des procédés que nous avons indiqués.

KEISER (*Biblioth. zool.*, VII, 1, 1891 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 3, 1891, p. 363) a indiqué les deux fixateurs suivants. (1) Solution saturée de cyanure de mercure dans l'eau, chauffée à 45 à 50° C. (15 à 60 minutes, laver dans l'alcool à 70 p. 100). (2) Acide picrique, 1 ;

Digitized by Google

acide sulfurique, 10 ; acide chromique, 1 ; eau, 1000. Chauffer à 55° C., laisser agir 15 à 20 minutes, laver 5 à 10 minutes dans l'eau chaude, puis dans l'alcool à 60 p. 100.

779. Géphyriens. — Pour préparer le *Sipunculus nudus*, il faut (Vogt et Yung, *Anat. comp. prat.*, p. 373) faire dégorger l'intestin des animaux pendant plusieurs jours dans de l'eau de mer pure dans des bassins à fond poli. (Il faut avoir soinde les changer chaque jour, car ils avalent de nouveau le sable expulsé.) Le meilleur agent pour les tuer en extension serait le chloroforme.

Ward (*Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*, XXI, 3, p. 144) met les animaux dans une cuvette avec de l'eau de mer et verse sur l'eau une couche mince d'alcool à 5 p. 100. Les animaux doivent se trouver anesthésiés au bout de quatre à huit heures.

Lo Bianco dit que l'acide chromique à 0,5 p. 100 ou l'hydrate de choral à 0,1 p. 100 dans l'eau de mer peut réussir, mais l'un et l'autre sont incertains. *Phascolosoma* et *Phoronis* doivent être traités par le procédé de l'alcool, n° 26.

Priapulus et *Halicryptus*. Apel (*Zeit. f. wiss. Zool.*, 1885, p. 461) recommande de les tuer ou bien en les mettant dans l'eau de mer qu'on porte graduellement à une température de 40° C. environ (pas plus), ou bien les plongeant brusquement dans de l'eau bouillante où on les maintient un instant. Cette manœuvre ne tue pas les animaux, mais les paralyse et les empêche de se contracter pendant qu'on les soumet à l'action d'un réactif fixateur. Parmi les fixateurs, Apel recommande l'acide chromique à 1/3 p. 100 ; l'acide picro-sulfurique ; le bichromate de potasse, et l'alcool. L'acide osmique ne pénètre pas suffisamment.

780. Rotateurs. — Pour l'observation des animaux vivants la narcotisation rend de grands services. Voir là-dessus le chapitre II. Vogt et Yung recommandent une solution de l'un ou l'autre des sels solubles de strychine.

Weber (*Arch. de Biol.*, VIII, 4, 1888, p. 713) préfère une solution à 2 p. 100 de chlorhydrate de cocaïne.

La confection de préparations permanentes de Rotifères est d'une difficulté extraordinaire. Elle n'est pas impossible. M. C. Rousselet a eu l'obligeance de m'envoyer des *Triarthra*, *Asplanchna*, *Notops* et *Brachionus* conservés qui ne laissent rien à désirer. Il opère ainsi : les animaux sont réunis dans un verre de montre avec un peu d'eau. On les narcotise en ajoutant graduellement quelques gouttes du mé-

Digitized by Google

lange suivant : — chlorhydrate de cocaïne à 2 p. 100, 3 parties ; alcool méthylisé, 1 partie ; eau, 6 parties. *Au moment* où les cils cessent de battre on les fixe en ajoutant quelques gouttes de solution d'acide osmique à 0,25 p. 100. Après une demi-minute on lave dans l'eau distillée renouvelée plusieurs fois, et l'on monte dans du formol à 2,5 p. 100 d'aldéhyde formique (c'est-à-dire un mélange de 2 1/2 volumes de formol avec 37 1/2 volumes d'eau).

Les préparations de Rousselet sont des chefs-d'œuvre pour le moment ; mais je doute que le formol puisse fournir une conservation indéfinie. Pour quelques autres détails voyez *Journ. Quekett. Mic. Club*, V. 2, March, 1895.

ANNÉLIDES

781. Lumbricus. — En vue des coupes, il faut commencer par débarrasser l'intestin du sable qu'il peut contenir. Kükenthal (v. *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1888, p. 1044) met les animaux dans un cristallisoir rempli de morceaux de papier buvard humecté. Ils évacuent graduellement l'intestin et le remplissent de papier. Vogt et Yung préfèrent le marc de café, comme se coupant mieux après inclusion que ne le fait le papier.

Narcotisation (Kükenthal, *Die mikroskopische Technik*, 1885 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1886, p. 61). — Mettre les animaux dans un verre cylindrique rempli d'eau à une hauteur de 10 centimètres ; verser sur l'eau une couche d'alcool à 70° p. 100, de 1 à 2 centimètres d'épaisseur. Après quatre à huit heures on trouvera les animaux narcotisés et l'on pourra les fixer.

Perrier recommande de mettre dans un coin du cristallisoir un verre à montre avec du chloroforme, et de couvrir le tout. L'anesthésie se produit dans une demi-heure.

Collin (*Zeit. f. wiss. Zool.*, XVLI, 1888, p. 474) procède à peu près de même pour *Criodrilus lacuum*. Il suspend dans le verre un morceau de papier buvard imbibé de chloroforme.

Cerfontaine (*Arch. de Biol.*, X, 1890, p. 327) injecte dans des *Lumbricus* par piqûre hypodermique 2 cc. d'une solution de curare à 1 : 500. Ensuite on met les animaux dans l'eau et au bout d'un quart d'heure on les trouve morts.

782. Polychètes. — D'après Lo Bianco, on peut souvent produire une bonne narcotisation de ces animaux au moyen d'eau de mer contenant 5 p. 100 d'alcool, ou par le mélange numéro 19.

Digitized by Google

Les *Polychæta sedentaria* offrent l'obstacle d'un appareil branchial compliqué et extrêmement contractile. On peut quelquefois obtenir de bonnes fixations en extension en portant les animaux brusquement dans une solution de sublimé. (Il faut prendre une solution *froide*, les solutions chaudes ratatinent souvent les branchies.) Les espèces de *Polychæta errantia* qui possèdent des branchies contractiles, comme *Eunice* et *Onuphis*, peuvent être traitées de même.

Lo Bianco recommande de tuer les *Chætopteridæ*, *Sternaspidæ*, *Spirographis* et *Protula*, en les mettant pour une demi-heure dans de l'acide chromique à 1 p. 100. On peut quelquefois forcer les Annélides sédentaires à s'étendre hors de leurs tubes en les mettant pour quelques heures dans de l'eau de mer contenant 0,1 p. 100 d'hydrate de chloral (Lo Bianco).

Voyez aussi d'autres méthodes au chapitre II.

783. Durcissement. — Je puis recommander comme excellent pour la fixation et durcissement d'*Annélides en général* un mélange dû à Ehlers. A 100 cc. d'acide chromique de 0,5 à 1 p. 100 on ajoute de 1 à 5 gouttes d'acide acétique cristallisable. La proportion d'acide acétique indiquée suffit à prévenir la tendance au ratatinement provoquée par l'acide chromique.

784. Vaisseaux sanguins d'Annélides (Kükenthal, *loc. cit.* n° 781). — Ouvrir les animaux et les mettre pendant deux à trois heures dans de l'eau régale (acide nitrique, 4 parties ; acide chlorhydrique, 2 parties). Les ramifications des vaisseaux se trouvent alors être colorées en noir, tout le reste en jaune.

785. Nerfs d'Annélides. — Méthode au bleu de méthylène, et méthode rapide de Golgi. Pour l'application de celle-ci voyez Lenhossek, *Arch. f. mik. Anat.*, XXXIX, p. 102 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, IX, 3, 1893, p. 342.

786. Hirudinées : fixation (Whitman, *Methods in Mic. Anat.*, p. 27). — Tuer par le sublimé chaud. Ce réactif, dit Whitman, tue les Sangsues avec une telle rapidité qu'elles meurent en général sans avoir pu changer la position dans laquelle elles se trouvaient au moment de subir le contact du liquide.

J'ai obtenu de meilleurs résultats (*Nephelis*, *Clepsine*) en narcotisant par l'acide carbonique, numéro 25, et en fixant par le mélange de

Digitized by Google

Flemming. Avec quelques cuillerées d'eau de siphon ajoutées à l'eau où les animaux se trouvent, on narcotise les petits exemplaires en quelques minutes; les grands demanderont plusieurs heures. Le jus de citron m'a aussi donné de bons résultats pour les tuer en extension.

Graf (*Jen. Zeit.*, 1893, p. 165) dit avoir obtenu de bons résultats en narcotisant par une décoction de tabac.

Injection (Whitman, *Amer. Natural.*, 1886, p. 318). — Il arrive très souvent qu'on obtienne des injections naturelles très parfaites chez des Sangsues qui ont été durcies dans de l'acide chromique faible ou dans un liquide chromique quelconque. Whitman pense que ces injections sont les meilleures pour l'étude du système circulatoire par la méthode des coupes.

Les Hirudinées (ou autres Annélides), sur lesquelles on désire faire des injections artificielles, doivent naturellement être tuées par un procédé qui laisse les tissus dans l'état mou propre à laisser couler l'injection. Jacquet (*Mitth. Zool. Stat. Neapel*, 1885, p. 298) recommande de mettre les Sangsues dans de l'eau contenant une faible quantité de chloroforme; elles tombent bientôt au fond du vase et y restent immobiles. Il faut les laisser un ou deux jours dans l'eau avant d'injecter.

ÉCHINODERMES

787. Holothurides. — Animaux extrêmement difficiles à fixer, parce que, sous l'influence des réactifs, ils se contractent avec une si grande violence que leurs viscères sont arrachés et expulsés par la bouche ou l'anus. De Castellarnau (*La Estacion Zool. de Napoles*, p. 136) recommande de les saisir par le milieu du corps, de les serrer fortement pour les empêcher de se contracter, et de les plonger pendant un instant dans de l'acide acétique, puis de remplir la cavité du corps d'alcool par injection et de mettre tout l'animal dans de l'alcool. Garbini (*Manuale per la technica mod. del Microscopio*, p. 155) conseille de narcotiser les Synaptes et les *Cucumaria* en ajoutant de l'éther à l'eau où elles se trouvent, et de les transporter dans de l'alcool à 35°. Pour notre compte, nous croyons que la manière la plus sûre pour faire mourir étalés les Holothurides, c'est de les mettre simplement dans l'eau douce ; ils y meurent sans se contracter et avec les tentacules déployés. La conservation des tissus est naturellement détestable.

Vogt et Yung (*Anat. Comp. prat.*, p. 641) disent que la *Cucuma-*

Digitized by Google

ria Planci (*C. doliolum* Marenzeller) n'a pas l'inconvénient de cracher ses intestins ; mais ils recommandent de la tuer par l'eau douce, ou par intoxication par l'alcool, l'acide chromique ou le sublimé, ajoutés à l'eau de mer. On peut laisser mourir les *Synaptes* dans un mélange à parties égales d'eau de mer et d'éther ou de chloroforme.

Le docteur WEBER m'a fait savoir que le formol convient admirablement pour la conservation des Holothurides. Il n'est pas nécessaire qu'il soit fort.

788. Astérides (HAMANN, *Beitræge zur Hist. d. Echinodermen*. Ht. 2, 1885, p. 2). — La fixation est ici également très difficile. On peut l'obtenir, les pieds ambulacraires, les branchies et les tentacules restant étendus, en plongeant les animaux dans de l'eau bouillante, et en les portant ensuite dans le liquide fixateur. Mais cette méthode a l'inconvénient que les réactifs ne pénètrent que lentement à l'intérieur du corps, ce qui fait qu'on n'obtient pas une fixation suffisante des organes internes. HAMANN conseille plutôt d'injecter l'animal vivant avec le liquide fixateur. On introduit la canule sous la peau de l'extrémité d'un bras et on injecte ainsi le réactif dans la cavité du corps. Les pieds ambulacraires et les branchies sont bientôt distendus par le liquide ; aussitôt que l'injection paraît avoir pénétré partout, on jette l'animal dans une certaine quantité du même réactif.

L'étude des *yeux* présente quelque difficulté. Pour les étudier sur des coupes tout en conservant autant que possible la pigmentation, il faut (*loc. cit.*, p. 19) enlever l'œil par la dissection, le durcir dans un mélange à parties égales d'acide osmique à 1 p. 100 et d'acide acétique à 1 p. 100, et l'inclure dans la gomme glycérinée ou quelque autre masse qui n'exige pas de traitement par l'alcool, réactif qui dissout le pigment, de sorte que les cellules pigmentaires y deviennent parfaitement hyalines. Pour les macérations, alcool au tiers ; le mélange acéto-osmique ne conserve pas les bâtonnets des cellules pigmentées.

Contrairement à ce que nous avons dit pour les Holothurides, le formol n'est pas à recommander pour la conservation des Astérides.

789. Échinides. — Je recommande de les tuer par injection. Pour la conservation, le formol se montre, de tous points, admirable, bien supérieur à l'alcool (WEBER).

790. Ophiurides. — Les tuer dans l'eau douce si l'on désire

Digitized by Google

éviter la désarticulation des bras (De Castellarnau, *La Estacion Zool. de Napoles*, p. 135).

791. Larves des Échinodermes (Barrois). — Nous devons à l'obligeance de M. le docteur J. Barrois les indications suivantes, que nous savons être le fruit d'une investigation approfondie des métamorphoses des Échinodermes.

Pluteus. — Il est nécessaire, pour étudier les métamorphoses des Ophiures et des Oursins dans de bonnes conditions, d'obtenir des préparations qui, tout en conservant les avantages présentés par les larves vivantes (netteté des différents organes, intégrité du squelette calcaire, qui est souvent d'une grande importance comme fournissant des points de repère des plus utiles), en ajoutent encore d'autres, et en particulier : 1° la netteté de la région où se forme le jeune Echinoderme, région généralement opaque chez la larve fraîche, et 2° une rigidité suffisante pour permettre d'orienter la larve sous le microscope et de la retourner commodément en tous sens.

Pour obtenir ces préparations, il y a quelques difficultés à surmonter, à cause de la nécessité de conserver le squelettte calcaire, tout en obtenant une coloration suffisamment élective. On arrive au but en employant le procédé suivant : — Le *Pluteus* est fixé par une solution froide et saturée de sublimé, dans laquelle on le laisse séjourner deux ou trois minutes ; puis on lave à l'eau douce et on colore par la cochenille de Mayer (ancienne formule) extrêmement diluée, au point d'être à peine colorée ; les objets séjournent de douze à vingt-quatre heures dans la teinture, et doivent être surveillés attentivement pour être retirés au moment voulu et conservés dans le baume, ou, ce qui vaut souvent mieux, dans l'essence de girofle ou de bois de cèdre. Ce procédé permet d'obtenir des préparations plus instructives que celles que l'on obtient par les moyens de coloration ordinaires, après décalcification, et aussi plus instructives que l'observation directe d'objets frais. Il convient parfaitement pour l'étude des principaux stades de la métamorphose.

Auriculaires et *Bipinnaires*. — Le procédé que nous venons de décrire est également applicable aux Auriculaires et aux Bipinnaires, et paraît être surtout la meilleure méthode pour l'étude de la métamorphose des Bipinnaires. Pour les premiers stades de la métamorphose des Auriculaires, on peut avec avantage remplacer ces méthodes par la fixation à l'acide osmique suivie de coloration par le carmin de Beale, les préparations étant conservées dans la glycérine.

Digitized by Google

Larves de Comatules. — Pour le développement embryonnaire de la Comatule, la méthode qui est le plus à recommander consiste à fixer par la liqueur de Lang (n° 63) et à colorer par le carmin au borax dilué. Il est important, pour les préparations qui ne sont pas destinées aux coupes, de n'employer que du carmin au borax dilué, sans cela les embryons se surcolorent et ne se décolorent plus que difficilement.

La narcotisation par l'hydrate de chloral avant la fixation rend de bons services, spécialement pour l'étude des Pentacrines et des jeunes Synaptes issues d'Auriculaires. Sans cette précaution on ne peut guère obtenir que des préparations de larves fermées (Pentacrines) ou entièrement déformées par la rétraction (jeunes Synaptes).

Voir aussi le travail de Mac Bride sur le développement de l'*Amphiura squamata*, dans *Quart. Journ. Mic. Sc.*, 1892, p. 131 (acide osmique suivi de liquide de Müller ; alcool ; décalcification par l'acide nitrique dans l'alcool ; paracarmin ou hæmalun de Mayer). Puis, pour les larves de Crinoïdes, Seeliger, *Zool. Jahrb.*, VI, 1892, p. 161 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, X, 2, 1893, p. 229.

CŒLENTÉRÉS

792. Actinies (O. et R. Hertwig, *Jenaisch. Zeit.*, 1879). — Les Hertwig narcotisent les Actinies par la méthode de la fumée de tabac (n° 16), les fixent en les injectant d'acide chromique à 1 p. 100 additionné de quelques gouttes d'acide osmique et en les plongeant dans le même liquide ; après quoi ils les lavent à l'eau et les conservent dans l'alcool à 75° pour être ensuite colorées et mises en coupes.

Pour les macérations, ils procèdent comme nous l'avons dit au numéro 512.

Andres, « *Le Attinie* », *etc.* ; « *Intorno all' Edwardsia Claparedii* » ; De Castellarnau, « *La Estacion Zool. de Napoles* », p. 131 à 133. — Le sublimé corrosif employé à chaud donne de bons résultats. Pour les petites formes, on s'en sert de la manière ordinaire, en en inondant les animaux ; pour les formes plus grandes, il faut l'injecter dans la cavité du corps. A cet effet, on remplit une seringue de verre de la solution, et l'on touche légèrement les bords de la bouche de l'animal avec le bout de la canule. Cet attouchement fait ouvrir la bouche, on injecte le liquide et on en inonde ensuite l'animal.

Le mélange de glycérine et alcool de Salvatore Lo Bianco (n° 19) donne aussi de bons résultats dans quelques cas.

Andres a aussi employé avec succès la narcotisation par la fumée

Digitized by Google

de tabac et par la nicotine ; nous avons également expliqué ces deux méthodes aux numéros 16 et 17.

Il a aussi réussi quelquefois en employant la congélation. Le vase contenant les Actinies est mis dans un récipient contenant un mélange de glace et sel de cuisine, ce récipient étant enveloppé de ouate. Après qu'on a obtenu la congélation, on dégèle le bloc de glace avec les animaux dans de l'alcool ou un acide.

Le chloroforme ne réussit que rarement, parce que la macération s'établit en général avant que la contractilité ait été perdue.

Pour les dissociations, ANDRES procède ainsi : Fixer par le sublimé; faire macérer pendant vingt-quatre heures dans l'alcool à 25° ; infiltrer par une solution de gomme arabique, d'abord faible et graduellement plus forte; durcir la masse dans l'alcool à 90°; dissocier les coupes avec des aiguilles.

793. Zoanthaires à squelette calcaire. — Fixation souvent très difficile à cause de la grande contractilité des Polypes. Nous conseillons d'essayer de les tuer et de les fixer par l'immersion brusque dans le sublimé, qu'il faudra souvent employer bouillant. DE CASTELLARNAU (*La Estacion Zool. de Napoles*, p. 132) dit que ce procédé réussit très bien pour les *Dendrophyllia*, *Antipathes*, *Astroides*, *Cladocora* et *Caryophyllia*.

Pour les coupes, nous rappelons qu'on peut employer, outre les méthodes ordinaires qui sont applicables aux pièces décalcifiées, la méthode de VON KOCH (n° 305), méthode qui, étant applicable aux pièces non décalcifiées et fournissant des préparations qui démontrent à la fois les parties molles et les parties squelettiques *in situ*, rend ici les services les plus précieux.

794. Alcyonaires. — Les Polypes sont aussi extraordinairement contractiles, et la fixation en conséquence très difficile. Nous conseillons le sublimé à chaud, ou bien, pour les études dans lesquelles la bonne conservation histologique n'est pas de première importance, la méthode à l'acide acétique cristallisable de VAN BENEDEN (n° 755). GARBINI (*Manuale*, p. 151) dit qu'on peut les fixer dans la position étalée en les inondant brusquement d'éther, et en les transportant après quelques minutes dans l'alcool à 35°.

Pour les coupes des formes à squelette calcaire, nous avons le choix entre les méthodes que nous avons indiquées dans le paragraphe précédent.

WILSON (*Mitth. zool. Stat. Neapel.*, 1884, p. 3) fixe les Alcyonaires

Digitized by Google

en les plongeant dans un mélange de 1 partie d'acide acétique fort avec 2 parties de solution concentrée de sublimé. Il lave rapidement et met les pièces pendant deux à trois heures dans une solution concentrée de sublimé, en ayant soin d'injecter les animaux avec la solution toutes les fois que cela est possible. Il lave d'abord dans l'eau de mer, puis dans l'eau distillée, et passe par des alcools successivement de plus en plus forts. Il a aussi obtenu de très bons résultats en fixant par une solution faible d'iode dans l'alcool et l'eau de mer; mais l'action de ce réactif est incertaine.

Pour la coloration, il préfère le carmin à l'alun aux autres carmins et à l'hématoxyline; mais il est nécessaire de colorer rapidement, car le tissu gélatineux du mésoderme souffre du ratatinement, si on l'expose trop longtemps à l'action des teintures aqueuses.

Pour la décalcification, l'acide nitrique ou l'acide chlorhydrique très faible dans l'alcool à 90°.

Pour la macération, le mélange des HERTWIG pour les Actinies, n° 512.

795. Zoanthaires et Alcyonaires (BRAUN, *Zool. Anzeig.*, 1886, p. 458). — BRAUN recommande d'ajouter au sublimé employé pour la fixation un peu d'acide osmique. Voici comment il procède pour *Alcyonium palmatum*, *Sympodium coralloïdes*, *Gorgonia verrucosa*, *Caryophyllia cyathus* et *Palythoa axinellæ*. On laisse les animaux pendant un ou deux jours dans un petit récipient en verre, de sorte qu'ils puissent s'étaler complètement. Puis, on les inonde brusquement d'un mélange de 20 à 25 cc. de solution concentrée de sublimé dans l'eau de mer additionnée de 4 à 5 gouttes d'acide osmique à 1 p. 100. Après cinq minutes, on enlève le liquide et on le remplace d'abord par de l'eau de mer, puis par des alcools successivement plus forts.

SCHULTZE (*Biol. Centralb.*, 1887, p. 760) dit que pour les Pennatulides à polypes volumineux l'addition graduelle d'eau douce donne de bons résultats.

Coupes. — Nous avons les méthodes ordinaires pour le matériel décalcifié; et pour les préparations non-décalcifiées les importantes méthodes de VON KOCH et d'EHRENBAUM, n°s 305 et 306.

Macerations. — La méthode des HERTWIG, n° 512. Laisser les pièces au moins un jour dans l'acide acétique, et puis dissocier dans la glycérine.

Voyez aussi LIST, *Zeit. f. wiss. Mik.*, IV, 2, 1887, p. 211.

Digitized by Google

796. Hydroïdes ; formes polypoïdes. — Les animaux doivent se fixer en général par le sublimé concentré et bouillant. On ne les y tient qu'un instant et on passe à l'alcool. La solution doit en général être employée à froid pour les Gymnoblastes, à chaud pour la plupart des Calyptoblastes. La narcotisation peut se faire par les méthodes indiquées dans les deux numéros précédents. Nous avons vu employer l'éther avec succès (Campanulaires). Les Hydres se fixent parfaitement par l'acide osmique. BRECKENFELD (*Amer. Mont. Mic. Journ.*, 1884 p. 49) tue les Hydres en les laissant s'étaler dans une goutte d'eau placée sur un porte-objet qu'il tient ensuite pendant trois à cinq secondes au-dessus du tube d'une lampe à pétrole.

797. Méduses ; fixation. — La fixation offre quelques difficultés pour les formes à tentacules contractiles, qui s'enroulent facilement au contact des réactifs.

Les meilleurs résultats que j'aie eus, avec ces formes, ont été obtenus au moyen du procédé à l'acide acétique de VAN BENEDEN, n° 755. Le secret du succès pour les espèces à tentacules très longs dépend d'une manœuvre, due à LO BIANCO, que je vais essayer de décrire. Mettez dans un cristallisoir, plutôt profond, une assez grande quantité d'acide acétique cristallisable. Tenez le cristallisoir dans la main gauche (ou bien dans les deux mains si vous avez un aide, ce qui vaut mieux). Tournez-le en cercle de façon à imprimer au liquide un mouvement rotatoire. De la main libre prenez dans une cuillère une de vos Méduses, avec aussi peu d'eau que possible. Jetez-la dans l'acide, tenu toujours en mouvement, et soutenez ce mouvement régulier de façon à faire bien étaler les tentacules derrière l'animal emporté dans le courant circulaire. Continuez ainsi jusqu'à ce que l'animal soit certainement mort, et passez-le dans l'alcool à 50 p. 100. N'essayez pas de fixer plus d'un animal à la fois, au moins avant d'avoir acquis une certaine pratique ; il vaut même mieux ne pas en passer plus d'un à la fois dans la même quantité d'alcool, car s'il s'en trouve plusieurs ensemble leurs tentacules peuvent facilement s'emmêler. Il y a utilité, selon LO BIANCO à soumettre *Oceania conica* et *Tiara* à une narcotisation préalable au moyen d'alcool à 3 p. 100 dans l'eau de mer. J'engage à éviter en tout cas le liquide de KLEINENBERG pour la fixation de ces sortes d'organismes.

Les formes qui n'ont pas des tentacules très contractiles peuvent être facilement fixées par le sublimé ou par un liquide osmique ou chromique. La *Cassiopeia borbonica* demande, selon de CASTELLARNAU, un traitement particulier, qui consiste à traiter les animaux par

Digitized by Google

l'acide osmique jusqu'à ce qu'ils commencent à changer de couleur, puis à les mettre pendant deux à trois jours dans le bichromate de potasse à 5 p. 100, et finalement dans l'alcool. J'ai essayé ce procédé, avec de forts bons résultats.

797. Méduses (O. et R. Hertwig, « *Das Nervensystem, etc., d. Medusen* », 1878, p. 4,5). — Fixer par l'acide osmique très dilué, et ne le laisser agir que quelques minutes.

Macération. — On peut fixer suffisamment les éléments cellulaires en les traitant pendant trois minutes par l'acide osmique à 0,05 p. 100, après quoi le traitement par la glycérine seule fournit un degré de macération qui est très souvent suffisant. Mais le procédé que nous avons décrit au n° 512 est meilleur.

On obtient l'isolation des éléments en frappant à petits coups sur la lamelle mince, procédé qui donne de meilleurs résultats que la dissociation par les aiguilles.

Ce procédé de fixation, suivi de traitement par l'acide acétique, donne une *coloration* suffisante. Je pense toutefois qu'on pourra obtenir des résultats encore meilleurs au moyen du procédé au pyrogallol ou à l'acide pyroligneux, n° 226.

Coupes. — Fixer dans l'acide osmique à 0,5 p. 100, cinq à quinze minutes ; colorer par le carmin de Beale dilué, ou par le picro-carmin (cette coloration a pour effet d'empêcher les pièces de se noircir outre mesure par l'osmium) ; conserver dans l'alcool faible. Pour l'inclusion, prendre un morceau de foie qui a été durci dans l'alcool, le fendre en deux, pratiquer sur chacune des surfaces de section une cavité qu'on remplit de solution de gomme glycérinée ; fixer l'objet à couper dans l'une de ces cavités avec des aiguilles, remettre les deux moitiés de foie en place, et placer le tout dans l'alcool dilué jusqu'à ce que la gomme ait acquis une consistance permettant de faire des coupes. Voyez aussi n° 302.

798. Siphonophores. — Ce groupe comprend quelques-uns des animaux les plus difficiles à fixer qui existent, comme le sont, par exemple les Physophores. On a à lutter non seulement contre la contraction et l'enroulement des zooïdes si extraordinairement contractiles, mais encore contre la désarticulation en masse des vessies natatoires et des polypes pêcheurs.

Bedot (*Arch. des Sci. phys. et nat.*, 1889, p. 556) donne les instructions suivantes :

On fait dans l'eau distillée, une solution de sulfate de cuivre de 15 à

Digitized by Google

20 p. 100. (Le degré de concentration peut varier un peu suivant l'espèce sur laquelle on agit.) Puis on jette vivement dans cette solution la colonie que l'on veut fixer. En procédant de cette façon, on se trouve obligé de verser en même temps que le Siphonophore une assez grande quantité d'eau de mer. Il faudra donc s'arranger de façon à ce que la solution de sulfate de cuivre représente un volume à peu près dix fois plus grand que celui de l'eau de mer. Une fois que le Siphonophore est fixé (ce qui a lieu au bout de quelques minutes), on ajoute à la solution quelques gouttes d'acide nitrique et l'on remue très doucement avec une baguette en verre, afin d'empêcher la formation de précipités.

On laisse le Siphonophore pendant quatre ou cinq heures dans cette solution, après quoi il convient de le durcir avant de le mettre dans l'alcool. On pourra se servir pour cela de différents réactifs durcissants. Les meilleurs résultats ont été obtenus en employant le liquide de Flemming composé de 15 parties d'acide chromique à 1 p. 100, 4 parties d'acide osmique à 2 p. 100, et une partie d'acide acétique glacial. Comme il convient autant que possible d'éviter de toucher le Siphonophore et de le changer de bocal avant son durcissement complet, on opérera de la façon suivante. On enlève une partie de la solution de sulfate de cuivre en en laissant seulement une quantité suffisante pour que le Siphonophore en soit encore recouvert. Puis on verse doucement le liquide de Flemming qu'on laisse agir pendant vingt-quatre heures au moins. Le volume du liquide de Flemming que l'on emploie doit être à peu près le double de celui de la solution de sulfate de cuivre.

L'opération la plus importante, dans la conservation de ces animaux, est le passage dans l'alcool, qui doit être excessivement lent et graduel. On commencera par ajouter au liquide dans lequel se trouve le Siphonophore quelques gouttes d'alcool à 25 p. 100 que l'on verse, avec une pipette, le plus loin possible de la colonie. Puis on augmente progressivement la dose et la concentration de l'alcool. Cette opération devra durer au moins 15 jours avant que l'on puisse employer de l'alcool à 70 p. 100. La conservation définitive se fera dans l'alcool à 90 p. 100.

D'après de belles préparations de Weber que j'ai eu l'avantage de voir, je puis dire que la conservation après fixation et lavage se fait parfaitement bien dans le formol, ce qui simplifie beaucoup les opérations.

J'ai essayé moi-même le procédé de Bedot, et j'ai pu constater qu'il a la propriété précieuse de conserver les pièces *sans aucune*

Digitized by Google

désarticulation des appendices, soit polypes, soit cloches natatoires, résultat qu'il est impossible d'obtenir avec les méthodes ordinaires.

La méthode de FRIEDLÆNDER a été donnée au n° 61.

LO BIANCO se sert pour la plupart des Siphonophores d'un mélange de 100 cc. de solution de sulfate de cuivre à 10 p. 100 avec 10 cc. de solution saturée de sublimé. Il l'emploie de la même manière que BEDOT. Cependant il tue les *Diphyes*, *Rhizophysa*, et *Physalia* dans des solutions de sublimé ; *Velella* dans l'acide chromo-picrique ou dans un mélange de 100 cc. de solution de sublimé avec 50 cc. d'acide chromique à 1 p. 100 ; *Porpita* par empoisonnement par le liquide de Kleinenberg.

Méthode de KOROTNEFF, n° 18. J'ai vu très bien anesthésier les *Physophores* au moyen d'éther.

799. Cténophores. — Les petites espèces se fixent très facilement. On peut employer le sublimé, l'acide osmique ou l'acide chromique. Nous recommandons surtout pour les petits individus, l'ajouter simplement quelques gouttes d'acide osmique à 1 p. 100 dans l'eau où les animaux se trouvent et de les y laisser jusqu'à ce que les tissus prennent une teinte grisâtre ; il n'est guère nécessaire d'employer d'autre coloration. DE CASTELLARNAU (*La Estacion Zool. de Napoles*, p. 135) recommande un mélange de 200 cc. d'acide chromique à 1 p. 100 et de IV à V gouttes d'acide osmique à 1 p. 100. Pour les *Callianira*, SALVATORE LO BIANCO emploie le mélange suivant :

Acide chromique à 0,5 p. 100	1	partie.
Acide pyroligneux concentré.	1	—
Sublimé, solution concentrée	2	—

On laisse les animaux de dix à quinze minutes dans ce liquide.

Pour *Beroe Forskalii* il recommande le mélange cuprique, numéro précédent. J'ajoute que le sulfate de cuivre ne convient nullement pour tous les Cténophores, car il y en a qui y deviennent opaques et si lourds qu'ils se brisent par leur propre poids. LO BIANCO traite la plupart des espèces par un mélange de 100 parties d'acide chromique à 1 p. 100 avec 2 parties d'acide osmique à 1 p. 100, *Cestus veneris* par l'acide chromo-acétique (il faut avoir soin d'enrouler l'animal dans un cristallisoir comme un ressort de montre, pour qu'il ne se déforme pas par son propre poids).

SAMASSA a réussi à faire des coupes de Cténophores par la méthode de l'inclusion double, n° 299, voyez *Arch. f. mik. Anat.*, XL, 1892, p. 157 ; *Zeit. f. wiss. Mik.*, 1893, p. 340.

Digitized by Google

PORIFÈRES

800. Spongiaires. — La fixation n'offre pas de difficultés du moment qu'il ne s'agit pas de conserver des pièces très volumineuses. On peut employer l'acide osmique, le sublimé, la liqueur de Kleinenberg, etc., ou l'alcool absolu, ce dernier réactif se montrant souvent plus utile que tous les autres. Dans tous les cas, il est bon de transporter les pièces un peu rapidement dans l'alcool relativement fort, car les tissus des Éponges macèrent avec une grande facilité dans les milieux aqueux. Pour cette raison aussi, nous conseillons de n'employer pour la coloration que des teintures alcooliques ; nous indiquons la cochenille de P. Mayer comme nous ayant donné d'excellents résultats.

Coupes. — Décalcifier les Éponges calcaires par l'alcool légèrement acidulé d'acide chlorhydrique ; inclure à la paraffine. Désilicifier les Éponges siliceuses par la méthode de P. Mayer (n° 541), si l'on juge que cela est absolument nécessaire. Mais en vue du danger inséparable de cette opération, on fera bien de se passer autant que possible de la désilicification. Nous avons trouvé qu'on peut obtenir des coupes, un peu grossières il est vrai, mais qui servent à l'étude de bien des sujets, en enrobant des Éponges non désilicifiées dans la paraffine, et en faisant des coupes à travers la masse. Les spicules se brisent devant le couteau, d'une manière si nette qu'ils paraissent être coupés. Il va sans dire qu'on fera bien de n'employer que ses plus mauvais couteaux pour cette besogne.

Coloration. — Nonobstant bien des indications en sens contraire qui se trouvent dans la littérature, je suis d'avis qu'on ne doit employer que des teintures *alcooliques*, et je recommande la cochenille de Mayer (ancienne formule) comme donnant les meilleurs résultats de toutes celles que j'ai essayées (je n'ai pas essayé les teintures récentes). Von Lendenfeld (*Zeit. f. wiss. Mik.*, XI, 1, 1894, p. 22) emploie des teintures aqueuses de Congo et de bleu d'aniline pour la coloration des cellules à flagellum.

Préparation du squelette. — On nettoie les spicules siliceux en les traitant à chaud par l'acide nitrique ou chlorhydrique concentrés, ou par une forte solution de potasse ou de soude caustique.

Les acides que nous avons nommés sont d'un emploi très efficace, mais il est reconnu qu'ils peuvent attaquer la silice pour peu que celle-ci soit délicate ; ainsi Dezsoe a trouvé que les petits spicules en

Digitized by Google

étoile de l'écorce du *Tethya lyncurium* sont complètement dissous par l'acide chlorhydrique bouillant. La potasse est donc souvent préférable, quoique, d'après notre expérience, elle donne des préparations moins propres. D'après Noll, l'eau de Javelle serait préférable à tous ces réactifs; nous avons décrit la méthode qu'il recommande au n° 528.

Imprégnation par le nitrate d'argent, — voyez la méthode de Harmer (n° 213).

Embryologie des Éponges, — voyez numéros 600 et 601.

PROTOZOAIRES

801. — Les Protozoaires sont, en général, faciles à examiner à l'état vivant dans le milieu même dans lequel ils vivent. Certains Infusoires ayant des mouvements très vifs, il est très difficile de les suivre sur le champ du microscope, surtout avec de forts grossissements. On obtient un ralentissement de leurs mouvements, et même on peut les fixer complètement, en les soumettant à une légère compression. Pour cela, on emploie la méthode que nous avons décrite au chapitre des « Méthodes embryologiques » et qui consiste à enlever une partie du liquide recouvert par la lamelle en l'aspirant au moyen d'un petit morceau de papier non collé. Avec un peu d'habitude, on arrive facilement à saisir le moment où l'on doit arrêter l'aspiration du liquide, pour que la compression ne déforme pas trop l'animal. Il suffit de suivre l'Infusoire sous le microscope; dès qu'on voit ses mouvements se ralentir, on enlève le petit morceau de papier placé sur le bord de la lamelle. Si l'observation se prolonge un peu, on doit de temps en temps déposer une gouttelette d'eau sur le bord de la lamelle, pour remplacer le liquide qui s'est évaporé et empêcher une compression trop forte des animaux.

Eismond (*Zool. Anz.*, 1890, p. 723) a proposé un moyen mécanique d'un autre genre pour confiner les mouvements de petits organismes (Vers et Crustacés, aussi bien qu'Infusoires). Il ajoute à l'eau dans laquelle on les observe une goutte de solution épaisse de gomme de cerisier « Kirschleim » ; la gomme arabique, etc., ne conviennent pas. Certes (*Bull. Soc. Zool. de France*, 1891, p. 93) dit que cette méthode donne d'excellents résultats. Mais il faut savoir qu'il n'est nullement facile de trouver un échantillon de gomme qui puisse servir. Cette gomme est très peu soluble et ses solutions ne se conservent pas (je dois ces renseignements à l'obligeance de M. le doc-

Digitized by Google

teur GRÜBLER). Un procédé similaire a été élaboré par JENSEN (d'après STAHL, *Biol. Centralb.*, XII, 1892, 18, 19, p. 556). On fait à l'aide de la chaleur une solution de 3 grammes de gélatine dans 100 cc. d'eau ordinaire. La solution n'est pas liquide à la température ordinaire. Pour s'en servir, on la chauffe légèrement, on en ajoute une goutte à l'eau qui contient les organismes dans un verre de montre, et on mêle les deux liquides.

Pour des méthodes de narcotisation, voir chapitre II. SCHÜRMAYER (*Jen. Zeit.*, 1890, p. 402; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 4, 1891, p. 493) a eu de bons résultats avec quelques espèces, parmi lesquelles *Stentor* et *Carchesium*, au moyen de nitrate de strychnine à 0,1 p. 100 ou moins.

L'étude de la structure des Protozoaires peut se faire presque entièrement sous le champ même du microscope, en soumettant ces animaux à l'action de différents réactifs que l'on fait arriver à leur contact par capillarité entre le porte-objet et la lamelle recouvrante. Il est bon de suivre directement l'action du réactif, car souvent tel détail qui devient très apparent au moment où commence à agir le réactif devient méconnaissable au bout de quelque temps et ne peut être observé sur les préparations permanentes.

Les corps qu'on désigne sous le nom de *noyau* et de *nucléole* ou d'*endoplaste* et d'*endoplastule*, jouant un grand rôle dans la morphologie et dans la biologie des Protozoaires, principalement des Infusoires, et ces corps présentant en général les mêmes réactions que les noyaux cellulaires, tous les réactifs fixateurs et colorants des cellules et des noyaux rendront de grands services dans l'étude des Protozoaires. L'un des plus importants est la solution aqueuse de vert de méthyle acidulée par l'acide acétique; c'est le réactif qui permet de déterminer le mieux et le plus rapidement la présence et la forme du noyau et du nucléole (BALBIANI et HENNEGUY, *Compt. rend. Soc. de Biologie*, 1881, p. 131). Nous donnons plus loin les principales méthodes qui permettent d'obtenir des préparations permanentes de Protozoaires, mais jusqu'à présent ces méthodes ne sont pas parfaites, et l'étude des meilleures préparations ne peut remplacer celle des animaux vivants ou soumis à l'action des réactifs sous les yeux mêmes de l'observateur.

Parmi les réactifs qui ne se trouvent pas mentionnés dans les méthodes que nous exposons d'après la description de leurs auteurs, nous citerons des solutions faibles d'alun, de potasse ou de borax qui mettent bien en évidence les stries de la cuticule des Infusoires et l'insertion des cils vibratiles.

Digitized by Google

802. Coloration des Infusoires vivants[1] (CERTES, *Comptes rendus Soc. de Biologie*, 1885, p. 197). — Les Infusoires vivants se colorent et peuvent continuer à vivre un certain temps dans une solution faible de certaines couleurs d'aniline, cyanine, brun Bismarck, violet dahlia, violet 5 B, chrysoïdine, nigrosine, bleu de méthylène, vert malachite, vert d'iode, etc., et dans l'hématoxyline. Les solutions doivent être faites avec le liquide dans lequel vivent les Infusoires : ces solutions ont un titre très faible variant de 1/10000 à 1/100000.

Le noyau se colore nettement chez l'animal vivant par les solutions de violet dahlia et de vert malachite. Le brun Bismarck ne colore le noyau que de certains Infusoires (*Nyctotherus*, *Opalina*). (HENNEGUY.) Le noyau se comporte du reste différemment dans des espèces quelquefois très voisines.

La double coloration du noyau en vert et du protoplasma en violet s'obtient par l'emploi simultané du violet dahlia et du vert malachite.

Il y a parfois utilité à examiner les Infusoires dans un milieu coloré dans lequel ils ne se teignent pas mais se détachent à l'état incolore sur un fond coloré. On peut prendre la solution de noir d'aniline (CERTES, *Bull. Soc. zool. de France*, 1888, p. 30), ou une solution concentrée de bleu diphénylamine (FABRE-DOMERGUE, *Ann. de micr.*, 1889, p. 545).

FIXATION ET CONSERVATION

803. Méthode de CERTES (*Comptes rend. de l'Acad. d. Sc.*, 1er sem. 1879, p. 433). — On expose, pendant dix à trente minutes, aux vapeurs d'acide osmique, les Infusoires déposés *sur une lame de verre*. Pour les Infusoires très contractiles, on dépose une goutte du réactif sur la lamelle elle-même, avant d'en recouvrir la goutte d'eau qui les renferme. On doit éviter tout déplacement de la lamelle de verre, et pour cela on soutire, avec du papier Joseph, le liquide qui se trouve en excès. On lute deux bords opposés de la lamelle avec de la paraffine ou du baume de Canada, puis on fait arriver le liquide colorant.

[1] La coloration des Infusoires à l'état vivant a été trouvée presque simultanément, et d'une façon indépendante, par BRANDT (*Verhandl. d. physiol. Ges.* Berlin, 1878), par CERTES (*Soc. zool.*, 25 janv. 1881) et par HENNEGUY (*Soc. philom.*, 12 fév. 1881). J'ai examiné au n° 97 la question de savoir jusqu'à quel point ces colorations doivent être regardées comme des teintures véritables, et celle de l'interprétation qu'à mon sens il convient de leur donner. (A. B. L.)

Digitized by Google

L'éosine et le picro-carminate donnent les meilleurs résultats. CERTES emploie le mélange suivant :

Glycérine	1	partie.
Eau	1	—
Picro-carmin	1	—

On fait arriver lentement le mélange ; pour cela on place dans une chambre humide les préparations lutées ainsi qu'il est dit ci-dessus et on dépose une goutte de glycérine carminée sur le bord de chaque préparation. L'eau s'évapore lentement et, au bout de vingt-quatre heures, se trouve remplacée par la glycérine pure.

804. Méthode de GÉZA ENTZ (*Zool. Anz.*, n° 96, 1881, p. 575). — Pour fixer les Infusoires, l'auteur emploie de préférence le liquide de Kleinenberg ; quelques gouttes de ce liquide sont ajoutées *à un verre de montre* contenant de l'eau avec des Infusoires. Au bout d'une à deux minutes, on enlève le liquide et on lave la préparation pendant environ une demi-heure avec de l'alcool pas trop fort. On peut monter les objets dans un mélange à parties égales de glycérine et d'eau, mais il vaut mieux les colorer au préalable. Au sortir de l'alcool, on traite, pendant dix à vingt minutes, par le picro-carmin. Pour les formes munies d'une carapace, telles que *Euglena spirogyra*, *Phacus*, Péridiniens, il faut plusieurs heures pour obtenir la coloration. On lave à l'eau jusqu'à ce qu'on ait enlevé l'acide picrique.

805. Méthode de BRASS (*Zeit. f. wiss, Mik.*, I, 1884, p. 39). — Brass emploie pour fixer les organismes unicellulaires le liquide suivant :

Acide chromique	1	partie.
Chlorure de platine	1	—
Acide acétique	1	—
Eau	400 à 1000	—

Pour les Protozoaires qui sont rendus opaques par des matériaux nutritifs, BRASS a adopté la méthode suivante : les animaux sont placés dans le liquide de Kleinenberg pendant trois à quatre minutes, puis dans l'eau avec une petite quantité d'ammoniaque, où ils reprennent leurs dimensions et leurs formes naturelles ; on neutralise l'ammoniaque par un peu d'acide acétique et on colore par le carmin ammoniacal. On lave et on examine dans la glycérine diluée. Les objets ainsi traités deviennent très transparents.

Brass a obtenu aussi de bons résultats avec une solution de sublimé.

Digitized by Google

806. Méthode de Cattaneo (*Bollettino scientifico*, nos 3 et 4, 1885). — L'auteur soumet les Infusoires à l'action des réactifs *sur le porte-objet*. Les fixateurs les meilleurs sont, d'après lui, le chlorure de palladium en solution aqueuse à 1-3 p. 100, et le chlorure double d'or et de cadmium à 1 p. 100. Le chlorure de sodium en solution de 20 à 30 p. 100 peut conserver des Protistes d'eau douce sans les déformer. L'iodure de mercure et de potassium en solution à 1-2 p. 100 rend des services dans l'étude de la structure protoplasmique.

Le sublimé en solution à 5 p. 100 et l'acide osmique à 1 p. 100 sont aussi de bons fixateurs.

Au second rang, Cattaneo place, comme agents fixateurs, l'acide picrique, l'acide chromique, le liquide de Kleinenberg, le bichromate de potasse.

L'alcool, l'acide citrique et le jus de citron fixent bien les Infusoires, mais ne permettent pas de conserver les préparations.

Comme colorants, le violet de méthyle, le violet de gentiane et le bleu de Lyon ne donnent pas de bons résultats; ils donnent une coloration uniforme. Le rouge Magenta et la fuchsine valent mieux, parce qu'ils colorent le noyau avec plus d'intensité que le protoplasma; la nigrosine et l'hématoxyline sont encore meilleurs; mais les réactifs colorants les plus recommandables sont le carmin ordinaire et le picro-carmin.

Cattaneo conserve ses préparations dans la glycérine ou l'essence de girofle.

807. Méthode de Saville Kent **et de** Berthold (*Manual of the Infusoria; Journ. of R. Mic. Soc.*, 1883, p. 451). — Pour la préparation des organismes inférieurs, Infusoires et Algues, les auteurs préfèrent à l'acide osmique une solution d'iodure de potassium, de couleur jaune tirant sur le brun.

808. Méthode de Waddington (*Journ. R. Microsc. Soc.*, III, 1883, p. 185). — Pour bien mettre en évidence les cils des Infusoires, l'auteur les fixe par quelques gouttes d'une solution de tannin, ou par une trace d'une solution alcoolique d'acide sulfureux.

809. Coloration des Flagella. — La méthode célèbre de Loeffler a subi plusieurs modifications, dont nous donnons la plus récente (*Centralb. f. Bakteriol.*, VII, 1890, p. 625; *Journ. Roy. Mic. Soc.*,

Digitized by Google

1890, p. 678). On fixe la préparation (par ex., pellicule d'une infusion, goutte d'un liquide de culture, etc.), par la pratique usuelle des bactériologistes, sur verre à couvrir (on étale la matière en couche très mince sur un verre à couvrir et l'on passe ce verre, lentement, trois fois à travers une flamme ; ou bien, on le laisse sécher plusieurs heures à l'étuve). On traite la préparation fixée par un mordant. Le mordant de Loeffler se fait comme suit. A 10 cc. de solution de tannin à 20 p. 100 on ajoute 5 cc. de solution de sulfate de fer et 1 cc. de solution aqueuse ou alcoolique de fuchsine, de violet de méthyle, ou de noir pour laine. (Pour certains organismes il convient d'ajouter quelques gouttes de solution de soude caustique à 1 p. 100 ; ainsi pour les bacilles typhoïdes, 1 cc., pour *Bacillus subtilis*, 28 à 30 gouttes, etc. Pour d'autres il faut ajouter à la solution de soude une trace d'acide sulfurique ; ainsi pour *Spirillum rubrum*, 9 gouttes.)

Le verre à couvrir ayant été fixé dans une flamme comme nous l'avons dit, on verse dessus pendant qu'il est encore chaud quelques gouttes du mordant ; on chauffe de nouveau pendant une demi-minute jusqu'à ce que le liquide commence à se vaporiser, et on lave, d'abord à l'eau distillée, puis à l'alcool. Puis on verse dessus la teinture, et l'on procède de même. La teinture de Loeffler consiste en une solution saturée de fuchsine dans l'eau anilinée (n° 167) (au mieux neutralisée jusqu'au point de précipitation par addition de solution de soude caustique à 0,1 p. 100).

Modifications du procédé de Loeffler.

Trenkmann (*Centralb.*, VI, 1889, p. 433; *Zeit. f. wiss. Mik.*, VII, 1, 1890, p. 79).

Brown, *Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1893, p. 268.

Julien, *ibid.*, 1894, p. 403.

Bunge, *ibid.*, 1894, p. 640; 1895, p. 129 et 248.

Le procédé de Van Ermengem, *ibid.*, 1894, p. 405, est une application de la réaction de l'acide osmique avec le tannin.

810. Coupes d'Infusoires. — Bien que les manipulations d'objets aussi petits soient assez délicates on peut obtenir des coupes des espèces les plus grosses (*Stentor*, *Bursaria*, *Nyctotherus*, etc.). Les Infusoires fixés par une solution forte d'acide osmique (2 p. 100 ou une solution saturée) sont déshydratés par l'alcool et l'essence de girofle ; puis placés dans un bain de paraffine dans un petit verre de montre. Au bout de quelques minutes on les porte, à l'aide d'une

Digitized by Google

aiguille à cataracte, sur un petit bloc de paraffine dure; on les oriente à l'aide d'une aiguille chauffée; après refroidissement on coupe. La coloration peut se faire après la fixation, ou mieux lorsque les coupes ont été collées sur le porte-objet par l'albumine de MAYER.

Digitized by Google

APPENDICE

811. Produits chimiques, etc. — Voyez numéro 99.

812. Nettoyage de lamelles et porte-objets neufs (HANAMAN; *Amer. Natural*, XII, p. 573). — Les traiter par un mélange de 8 parties de solution saturée de bichromate de potasse et 1 partie d'acide sulfurique fort. Il faut user de précaution en faisant le mélange, à cause de la chaleur et des vapeurs qui se dégagent.

SEILER (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1880, p. 508) recommande de placer les lamelles et porte-objets *neufs* pendant quelques heures dans une solution contenant 2 parties de bichromate, 3 d'acide sulfurique et 25 d'eau. On les lave ensuite à l'eau, on laisse égoutter et l'on essuie avec un linge.

FOL (*Lehrb.*, p. 132) prescrit ou bien une solution contenant 3 parties de bichromate, 3 d'acide sulfurique et 40 d'eau ; ou bien simplement l'acide nitrique dilué.

H. GIBBES (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1880, p. 392) les met pendant une heure ou deux dans de l'acide sulfurique fort, lave à l'eau jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne plus de réaction acide, puis lave à l'alcool.

GARBINI (*Manuale*, p. 31) les laisse pendant un jour dans de l'acide sulfurique au dixième, puis lave à l'eau et ensuite à l'alcool.

BEHRENS (*Zeit. f. wiss. Mik.*, 1885, p. 55) les traite d'abord par l'acide nitrique concentré, puis successivement par l'eau, l'alcool et l'éther.

Lorsqu'on emploie, pour coller les coupes à la paraffine, uniquement l'eau distillée suivant la méthode du numéro 318, il importe de

Digitized by Google

faire usage de porte-objets exempts de toute trace de graisse et sur lesquels l'eau s'étende de manière à couvrir entièrement le verre. Pour avoir des porte-objets réalisant ces conditions, le meilleur moyen consiste à les faire bouillir pendant quelques minutes dans de l'eau de savon, on les rince à l'eau distillée et on les conserve dans l'alcool à 90°. Il faut prendre les lames avec une pince en évitant d'y toucher avec les doigts. Au moment de s'en servir, on retire les lames de l'alcool, qu'on laisse évaporer ou qu'on essuie avec un linge très propre.

813. Nettoyage de lamelles et porte-objets employés. — Ici, il faut d'abord enlever le baume ou la résine damar, ou le vernis qui a servi à luter les préparations faites dans un milieu aqueux, et pour cela, il faut commencer par détacher la lamelle du porte-objet.

Cela se fait très facilement pour le baume en chauffant.

Les lamelles ayant été détachées, Seiler (*loc. cit.*) recommande de les mettre pendant quelques jours dans un mélange d'alcool et d'acide chlorhydrique à parties égales, puis de les traiter par la solution de bichromate que nous avons indiquée au paragraphe précédent.

Un moyen très pratique pour débarrasser les porte-objets de baume, de résine damar, ou de certains luts, c'est de les arroser d'eau et de les racler avec un couteau.

James (*Journ. Roy. Mic. Soc.*, 1886, p. 548) recommande de les traiter par un mélange à parties égales de benzine, d'essence de térébenthine et d'alcool.

814. Gomme pour coller les étiquettes sur le porte-objet. — On sait qu'il est extrêmement difficile d'assurer l'adhésion permanente des étiquettes de papier au verre ; les mucilages simples de gomme arabique ne méritent aucune confiance à cet égard, et les diverses modifications qui ont été proposées ne paraissent guère plus efficaces. Le *Journal of the Chemical Society* déclare qu'on arrive au but avec la préparation suivante : — On fait dissoudre 100 grammes de gomme arabique dans 250 cc. d'eau, et l'on ajoute 2 grammes de sulfate d'alumine cristallisé, dissous dans 20 cc. d'eau.

Fol (*Lehrb.*, p. 148) recommande de préparer le porte-objet en y étalant une couche de gélatine au chlorure d'aluminium dissoute dans l'acide acétique, qu'on laisse sécher avant de poser l'étiquette.

Digitized by Google

815. Formol. — Appendice aux numéros 93 et 681. Parker et Floyd (*Anat. Anz.*, XI, 5, 1895, p. 156) ont trouvé qu'une « solution de formol à 2 p. 100 » durcira bien un encéphale de Mouton en huit à dix jours. Il s'y produit cependant un gonflement qui peut aller jusqu'à une augmentation de 40 p. 100 du volume primitif. Pour remédier à cet inconvénient, ils combinent le formol à l'alcool, en raison de 6 volumes d' « alcool à 95 p. 100 et 4 volumes de formol à 2 p. 100 ». Comme d'autres auteurs, Parker et Floyd ne disent pas si par « formol à 2 p. 100 » ils entendent 2 volumes de formol avec 98 d'eau, ou bien plutôt du formol allongé jusqu'à contenir 2 p. 100 d'aldéhyde formique.

816. Brun Bismarck. — Appendice au numéro 178. L'attribution à Paul Mayer de la recommandation d'une solution saturée de brun Bismarck dans l'alcool à 70 p. 100 est erronée, d'après ce que nous écrit ce savant.

817. Clasmatocytes. — Ranvier (*C. R. Acad. d. Sc.*, 1890) a décrit sous le nom de clasmatocytes des éléments particuliers, ayant une grande affinité avec les « Mastzellen », qui se trouvent dans les membranes connectives minces des Vertébrés et qui présentent des prolongements s'effritant pour constituer des *îlots* de granulations. Il les met en évidence en tendant convenablement la membrane (grand épiploon des Mammifères, mésentère des Batraciens) sur une lame de verre et en laissant tomber à sa surface quelques gouttes d'une solution d'acide osmique à 1 p. 100. Au bout d'une à deux minutes on lave à l'eau distillée et on colore avec le violet de méthyle 5B en solution étendue (1 partie de solution concentrée pour 10 parties d'eau distillée). Lorsque la coloration est suffisante, on recouvre d'une lamelle. On peut aussi ajouter de la glycérine pour rendre la préparation persistante, mais il se produit alors une diffusion de la matière colorante qui nuit à la netteté des détails. Il vaudrait mieux ajouter du liquide de Brun.

818. Mélange dissociateur efficace (Soulier, *Travaux de l'Inst. zool. de Montpellier et de la st. marit. de Cette. Nouv. sér. mém.*, 2, 1891, p. 171 et suiv.). — Soulier, dans ses recherches sur les Annélides tubicoles a fait une étude spéciale des agents dissociateurs. Il a essayé la solution à 10 p. 100 de sulfocyanure d'ammonium ou de potassium, déjà employée par Stirling (*Journ. Anat. and Physiol.*, 1883, p. 208) et a reconnu qu'elle altère les éléments au plus haut degré, mais il a obtenu de très bons résultats, en ajoutant à cette solution un fixateur. Il appelle *liquide dissociateur efficace* le mélange d'un liquide dissociateur quelconque et d'un liquide

Digitized by Google

fixateur quelconque en proportions convenables. Les proportions des deux liquides varient suivant la nature des éléments à dissocier et doivent être déterminées par tâtonnement. SOULIER a préparé les séries de liquides suivantes :

	N°s 1,	2,	3,	4,	5,	6,	7,	8.
Sulfocyanure d'ammonium ou de potassium à 10, 5, 2.5. 1,25 p. 100.	20 cc.,	30 cc.,	35 cc.,	36 cc.,	37 cc.,	38 cc.,	39 cc.,	39 cc.,5
Liqueur de Ripart et Petit.	20 cc.,	10 cc.,	5 cc.,	4 cc.,	3 cc.,	2 cc.,	1 cc.,	0 cc.,5

Les séries faites avec une solution de sulfocyanure à 2 p. 100 lui ont donné les meilleurs résultats.

SOULIER a obtenu aussi un dissociateur efficace en remplaçant le sulfocyanure par le sérum artificiel de Kronecker associé au liquide de Ripart et Petit. La pepsine, l'eau de Javelle, le sulfate de soude à la dose de 10 p. 100, une solution de soude caustique à 1,25 p. 100, avec le liquide de Ripart et Petit donnent aussi de bons dissociateurs efficaces.

Enfin, avec le chlorure de sodium, la potasse et le soude, on peut employer, à la place du liquide de Ripart et Petit, un liquide fixateur quelconque.

819. Hématoxyline DE VIALLANES, pour le système nerveux central (*Ann. des sc. nat.*, XIII, 1892, p. 356). On mordance les pièces pendant douze heure dans une solution de sulfate de cuivre à 1 p. 100 dans l'eau distillée. On lave ensuite pendant cinq à six heures dans l'eau distillée, fréquemment renouvelée. On colore pendant douze heures dans une solution fraîchement préparée de 0gr,25 d'hématoxyline dans 25 cc. d'alcool absolu avec 75 cc. d'eau parfaitement distillée. On traite ensuite pendant douze heures par une solution de sulfate de cuivre à 1 p. 100, on lave pendant plusieurs heures et on passe à l'alcool (parfaitement neutre), puis au chloroforme suivi d'inclusion dans la paraffine.

C'est une méthode excellente pour le système nerveux central d'Invertébrés. Elle a été expérimentée par DE NABIAS pour les Mollusques (*Rech. hist. et org. sur les centres nerveux des Gastéropodes*, Bordeaux, 1894, p. 27), par BINET pour les Insectes (*Journ. de l'Anat. et de la Physiol.*, 1894), et par l'un de nous (HENNEGUY) pour d'autres objets. Elle donne une coloration cylindraxile. BINET traite par la safranine après la différenciation dans le sulfate de cuivre, et obtient ainsi des différenciations encore plus prononcées.

820. Coloration à nouveau de vieilles préparations. — De vieilles préparations dont la coloration s'est altérée, ou dont on veut changer la coloration ou le médium, peuvent souvent être facilement

Digitized by Google

démontées, débarrassées du médium, et colorées à nouveau. Bien des vieilles préparations reprises ainsi avec de nouveaux procédés de coloration m'ont donné d'agréables surprises (HENNEGUY). S'agit-il de coupes, on se trouvera bien de les avoir collées sur le porte-objet par l'albumine de MAYER.

821. Mélange acidophile d'Ehrlich (mélange pour cellules éosinophiles, mélange C; cité d'après une communication du Dr GRÜBLER). Appendice au numéro 747. — Ce mélange consiste en : aurantia, éosine et induline, de chacune 2 parties, avec 30 parties de glycérine. D'après NIKIFOROW (*Zeit. f. wiss. Mik.*, VIII, 2, 1891, p. 189, et XI, 2, 1894, p. 246) ce mélange serait non seulement utile pour le but pour lequel il a été imaginé (coloration de certains granules de leucocytes), mais aussi pour la coloration de coupes sur porte-objet. Il convient de colorer pendant vingt-quatre heures, de laver à l'eau, de déshydrater rapidement et de monter au baume. La coloration serait très élective et permanente.

822. Coloration spécifique de la névroglie, de WEIGERT (WEIGERT, *Beitræge zur Kenntniss der normalen menschlichen Neuroglia*. Frankfurt a. M., 1895; cité d'après *Neurol. Centralb.*, 1895, n° 23, p. 1146). — Des portions de matériel de pas plus d'un demi-centimètre d'épaisseur sont mises pendant au moins quatre jours dans « une solution de formol à 10 p. 100 » (le texte ne dit pas s'il faut entendre du formol allongé de 9 volumes d'eau, ou bien de seulement 3 volumes d'eau, ce qui ferait 10 p. 100 d'aldéhyde formique). Elles sont ensuite mordancées pendant quatre à cinq jours dans un incubateur (ou pendant huit jours au moins à la température ordinaire) dans un mélange de 5 p. 100 d'acétate neutre de cuivre, 5 p. 100 d'acide acétique, et 2 et demi p. 100 d'alun de chrome, dans l'eau. (Pour faire ce réactif, on ajoute l'alun de chrome à l'eau, on porte à l'ébullition, et l'on ajoute l'acide acétique et l'acétate en poudre.) Après mordançage, on lave les pièces à l'eau, on les déshydrate, on les enrobe à la celloïdine, et l'on fait des coupes.

Les coupes sont traitées pendant dix minutes par une solution à un tiers p. 100 de permanganate de potasse, et sont bien lavées à l'eau. Elles sont maintenant traitées pendant deux à quatre heures par une solution de « Chromogen ». Le « Chromogen » est un composé de napthaline préparé par la fabrique de couleurs à Höchst. La solution en question se prépare comme suit : on fait dissoudre 5 p. 100 de Chromogen et 5 p. 100 d'acide formique dans l'eau et l'on

Digitized by Google

filtre soigneusement. A 90 cc. de la solution on ajoute 10 cc. d'une solution de sulfite de soude à 10 p. 100. Après ce traitement on met les coupes jusqu'au lendemain dans une solution aqueuse saturée (5 p. 100) de Chromogen. On lave soigneusement à l'eau et on passe à la coloration.

La coloration se fait par une modification du procédé de WEIGERT pour la fibrine (n° 747). Au lieu de la solution aqueuse de violet de méthyle, on prend une solution saturée à chaud dans l'alcool à 70 ou 80 p. 100, qu'on décante après refroidissement et qu'on additionne de 5 p. 100 de solution aqueuse à 5 p. 100 d'acide oxalique. Et au lieu de traiter par l'huile d'aniline pure, on prend un mélange d'aniline et de xylol à parties égales. On débarrasse ensuite soigneusement les coupes de ce mélange en les traitant par le xylol pur, et l'on monte au baume.

WEIGERT a conclu de la réaction obtenue par ce procédé que la névroglie ne consiste pas en un feutrage de prolongements de cellules nerveuses, mais en une substance intercellulaire qui se comporte comme une substance conjonctive.

Digitized by Google

TABLE ALPHABÉTIQUE

DES NOMS D'AUTEURS

A

Pages.

ADAMKIEWICS, coloration spécifique des centres nerveux 421
AGASSIZ et WHITMAN, embryologie des Poissons osseux 344
ALFEROW, imprégnations par l'argent. 167
ALLEN, bleu de méthylène. 148
ALT, coloration cylindraxile . . . 393
ALTMANN, bioblastes 365
— étuve thermostatique. . 204
— méthodes de fixation. . 40
— préparation par corrosion 319
ANDEER, liquide décalcifiant . . 322
ANDRES, étude des Actinies. . . . 458
— narcotisation par la nicotine. 16
— « Schnittstrecker » . . . 209
ANGELUCCI, rétine 382
APATHY, bleu de méthylène. . 144, 146, 148, 149, 151
— coupes en séries. 246
— hématoxyline 106
— inclusion à la celloïdine . 220, 222, 225
— lut 285
— sirop conservateur. . 151, 267
APEL, étude des Géphyriens . . . 452
ARCANGELI, carmins de 87
ARNOLD, hématoxyline de. . . . 102
— liquide de FLEMMING . . . 38
ARNSTEIN, bleu de méthylène. 146, 148, 150

Pages.

ARONSON, coloration à la galléine. 422
AUBERT, styrax. 279
— ténacités relatives des mastics 281
AZOULAY, imprégnation de nerfs par l'osmium 176

B

BABER, picro-carmin. 86
BABES, safranine de. 129
BALBIANI, embryologie des Phalangides. 349
— noyau vitellin 364
BALBIANI et HENNEGUY, vert de méthyle 140, 467
BALFOUR et FOSTER, embryologie des Oiseaux. 337
BALFOUR, embryologie des Araignées. 349
BALZER, tissu élastique. 428
BARRETT, coupes de l'œil entier. . 382
BARROIS (J.), métamorphoses des Échinodermes. 457
BASTIAN, chlorure d'or 173
BAUMGARTEN, coloration du cartilage et du tissu osseux.. . . . 181, 431
— fuchsine et bleu de méthylène 191
— recherche de mitoses dans les tubercules. 365

Digitized by Google

Pages.

BAYERL, coloration des corpuscules sanguins dans les tissus. 180
— étude de la ligne d'ossification. 431
— liquide décalcifiant. . . 321
BEALE, carmin de 87
— gelée à la glycérine . . . 271
— liquide digestif. 317
— masses d'injection. . . 306, 307
BECHTEREFF, centres nerveux . . 402
BECKER, inclusion au blanc d'œuf. 235
BECKWITH, imprégnations de nerfs par l'or 385
BEDOT, Siphonophores 462
BEHRENS, induline et nigrosine. . 159
— luts et vernis. 281
— nettoyage de lamelles et porte-objets 472
— vernis à l'ambre 286
BEHRENS, KOSSEL et SCHIEFFERDECKER, levulose 268
BALÉ-HALLER, liquide macérateur. 315
BELL, mastic de 283
BELLONCI, recherches sur le nerf optique 419
BENDA, hématoxyline à l'alun de fer. 107
— — au sulfate de fer . . 109
— — à l'acétate de cuivre. 109
— méthode de fixation . . . 41
— safranine et Lichtgrün ou Sæureviolett 183
— spermatogenèse 366
BENECKE, fibrilles collagènes . . . 423
BENEDEN (VAN), alcool acétique . . 58
— embryogénie du Lapin. 333, 334
— embryogénie des Ténias. 350
— œuf d'*Ascaris*. 365
— préparation des Ascidies composées. 440
BERGONZINI, cellules plasmatiques. 428
BERKLEY, cervelet du Chien. . . . 405
— foie 438
— méthode rapide pour l'hématoxyline de WEIGERT 419
BERLINER-BLAU, régénération de l'hématoxyline de WEIGERT 415
BERNHEIM, imprégnation par l'or. 174
— vessie de la Grenouille. 380
BERNHEIMER, rétine. 383
BETHE, bleu de méthylène 152
BETZ, carmin à l'ammoniaque . . 87
— durcissement des centres nerveux. 402

Pages.

BIANCO (S. LO), fixation d'animaux contractiles. . . . 17, 19
— mélange pour narcotiser les animaux . . . 19
— mélange fixateur . . . 58
— méthodes zoologiques . 439
— — Bryozoaires . . 441
— — Géphyriens . . 452
— — Méduses. . . . 461
— — Némertiens . . 450
— — Polychètes. . . 453
— — Siphonophores. 464
— — Tuniciers.. . . 440
BICKFALVI, liquide digestif 317
BIEDERMANN, bleu de méthylène . 148
BIONDI, sang 434, 436
BIZZOZERO, macérations d'épithéliums. 367
— picro-carmin. 86
— violet de gentiane . . 131
— et TORRE, préparation du sang 433
BJELOUSSOW, masse d'injection. . 305
BLANC, coloration au safran . . . 110
BLASCHKO, macération d'épithéliums 368
BLAUE, coupes d'épithéliums . . . 367
BLOCHMANN, embryologie des Amphibiens. 340
BLUM, formol 64
BOBRETSKY, embryologie des Lépidoptères 348
BOCCARDI, imprégnation par l'or . 173
BŒHM, chlorure d'or. 173
— imprégnation de GOLGI . . 391
BŒHMER, hématoxyline. 100
BŒHN, carmin de 87
BŒTTCHER et HERMANN, méthode de coloration. 122
BOLLES LEE, acide osmique et pyrogallol 174
— baume de SEILER . . 276
— bleu Victoria. . . . 133
— bleu Victoria et fuchsine acide 185
— conservation de matériel. 8
— colophane 275
— essence de bois de cèdre. 254
— formol 67
— Hirudinées. 454
— inclusion à la paraffine. . . 202
— — à la celloïdine . . 229

Digitized by Google

Pages.
Bolles Lee, « inversion » des colorations de Rawitz. 136
— jus de citron comme fixateur 20
— Kernschwarz et safranine 112
— montage de préparations liquides. . . 282
— Némertiens. 449
— pratique des éclaircissements. . . . 252
— sur l'albumine de Mayer 242
Born, embryologie d'Amphibiens. 342
— inclusion dans la paraffine. 196, 209
— reconstruction de coupes. 330
— et Wieger, méthode pour coller les coupes. 244
Bouma, coloration du cartilage . . 431
Boveri, nerfs 396
— œuf d'*Ascaris* 365
— — d'Échinodermes . . . 365
Brady, liquide au chloral. 261
Brandt, gelée à la glycérine. . . 271
Brass, carmin alcoolique. 90
— étude des Infusoires . . . 469
— inclusion à la paraffine. 201, 214
— masse d'inclusion. 215
Braun, préparation de Nématodes. 451
— Rhabdocoeles 448
— Zoanthaires et Alcyonaires. 460
Breckenfeld, fixation des Hydres. 461
Breglia, hématoxyline de Weigert. 415, 419
Bremer, plaques motrices. 377
Bristol, régénération de l'osmium réduit. 28
Brock, liquide macérateur. . . . 314
Brœsicke, méthode d'imprégnation. 176
Brown, cils et flagella 471
Brücke, liquide digestif. 317
— masse d'injection. . 298, 309
Brun, coloration combinée. . . . 192
— sirop conservateur. 267
Brunotti, inclusion à la gélatine. 217
Budge, masse d'injection. 310
Bumpus, inclusion à la celloïdine. 229
Bunge, cils et flagella. 471
Bunger, liquide de Flemming. . . 37
Burci, tissu élastique. 429
Burckhardt, centres nerveux de *Protopterus* 405
Bürger, Némertiens. 450
Busch, coloration double. 182

Pages.
Busch, méthodes de décalcification. 319, 320
Busse, inclusion à la photoxyline et à la celloïdine. 219, 221, 222, 223
Bütschli, hématoxyline à l'acétate de fer. 108
— — de Delafield . . . 102
— inclusion à la paraffine. 203

C

Cajal (Ramòn y), chromate d'argent de Golgi, imprégnation double 388
— ganglions sympathiques 388
— nerfs moteurs et écorce cérébrale 388
— rétine 382, 389
— terminaisons nerveuses. 376
Calberla, embryogénie des Cyclostomes 344
— inclusions au blanc d'œuf 235
— induline.. 159
— liquide additionnel et conservateur. 270
— liquide macérateur. . . 313
— vert de méthyle. . 139, 190
Caldweli, méthode pour coller les coupes. 240
Canfield, iris. 379
Cantacuzène, oxychlorure de ruthénium. 177
Capparelli, matière amyloïde. . 143
Carazzi, dépigmentation. 325
Carnoy, alcool acétique 58
— expériences de contrôle en cytologie 356
— liquide additionnel. . . . 264
— maturation de l'œuf d'*Ascaris*. 365
— mastic au baume de tolu. 287
— méthodes cytologiques 354, 356, 365
— méthodes de fixation 39, 50, 58, 59
— solution physiologique de sel de cuisine 260
— vert de méthyle. . . 140, 264
Carpenter, luts et vernis. 281
Carrière, chlorure d'or 371
— corpuscules tactiles. . 371

Digitized by Google

Pages.
CARRIÈRE, méthode de dépigmentation. 442
— yeux de Gastéropodes. 442
CASTELLARNAU (DE), fixation des Cténophores. 464
— — des Holothurides. . . 455
— — des Méduses. 461
— — des Mollusques . . . 441
— — des Némertiens. . . 449
— — des Ophiures. . . . 457
— — Zoanthaires à squelette calcaire. . 459
CATTANEO, étude des infusoires. . 469
— méthodes de fixation. 53
CAVAZZANI, hématoxyline et fuchsine acide et orange. 183
CERFONTAINE, *Lumbricus*. 453
CERTES, Infusoires. 468
CHEATLE, appareil pour déshydratation 6
CHENZINSKY, bleu de méthylène et éosine. 191
CHICHKOFF, fixateur pour Dendrocœles 449
CHIEVITZ, rétine. 382
CHOLODKOWSKY, embryologie des Blattides. 349
CIACCO, cornée. 373
— corpuscules de GOLGI. . . 378
— imprégnation par le chlorure d'or et de cadmium. 378
— plaques motrices. 377
CIAGLINSKI, centres nerveux. . . . 402
— coloration de centres nerveux 421
« C. M. J. », solution de damar. 277
COBB, différenciateur de. 6
COHNHEIM, chlorure d'or. 171
COLE, inclusion par congélation. 234
COLLIN, *Criodrilus* 453
COLUCCI, rétine 383
CONTEJEAN, hématoxyline. 101
COOK, hématoxyline de. 103
CORI, conservation de solutions d'acide osmique. 28
— *Cristatella*. 441
— liquide de FLEMMING 37
— méthode d'anesthésie. . . 17
CORNIL, liquides conservateurs. . 262
COX, imprégnation d'après GOLGI. 411
CUCCATI, carmin à la soude . . . 87

Pages.
CUCCATI, hématoxyline. 105
— picrocarmin. 86
— rétine 382
CURSCHMANN, vert de méthyle. . . 140
CYBULSKY, imprégnation par l'or. 174
CZOKOR, cochenille. 83
— mastic de térébenthine. . 284

D

DAVIDOFF, mélange fixateur pour œufs de *Distaplia*. 345
DASZKIEWICS, cellules plasmatiques. 426
DEANE, gelée à la glycérine . . . 271
— médium conservateur . . 265
DECKER, « Schnittstrecker » . . . 209
DEECKE, durcissement du cerveau entier. 404
— enrobage des centres nerveux. 406
DEKHUYSEN, imprégnations. . . . 166
— sang. 434
— tissu adipeux 424
DELAFIELD, hématoxyline de . . . 101
DELAGE, carmin à l'acide osmique. 87
— Rhabdocœles. 448
DENISSENKO, rétine. 381, 382
DEZSOE, Éponges siliceuses. . . . 465
DIMMOCK, sur l'acide carminique . 76
DIOMIDOFF, centres nerveux . . . 402
DIPPEL, hématoxyline de. 105
DOGIEL, bleu de méthylène, 148, 150, 153
— colorations vitales. . . . 146
— corpuscules de Herbst et de Grandry. . 371
— — de Meissner . . 371
— iris 379
— organes olfactifs. 372
— rétine. 382
DONALDSON, durcissement de centres nerveux 401
DOSTOIEWSKY, iris 379
DOYÈRE, étude des Tardigrades. . 447
DRASCH, imprégnations à l'or. . . 170
DUNHAM, éclaircissement des coupes à la celloïdine. 227
DU PLESSIS, Némertiens 450
DURHAM, coupes en séries . . . 238
DURIG, formol. 66
DUTILLEUL, carmin picro-borate. . 91
DUVAL, carmin et bleu d'aniline . 180
— centres nerveux, coloration 407
— durcissement de l'encéphale entier. 404
— embryologie des Oiseaux. 338

Digitized by Google

Pages.
DUVAL, inclusions au collodion . . 219
— nitrate d'argent 166

E

EBNER (VON), liquide décalcifiant . 430
EDINGER, liquide d'Erlicki 45
EHLERS, liquide fixateur 34
EHRENBAUM, méthode d'inclusion . 233
EHRLICH, bleu de méthylène . . . 146
— cellules plasmatiques. 425-426
— classification des couleurs de la houille . . 120
— colorations de nerfs *intra vitam*. 146
— dahlia, et autres teintures d'aniline 132
— hématoxyline de 102
— liquide de (Gentiane). . 132
— mélange triacide 189
— mélange pour granules-éosinophiles (Éosine-aurantia-induline) . . 476
— Neutralroth. 156
EHRLICH-BIONDI-HEIDENHAIN, coloration combinée. 186
EICHLER, oreille interne 384
EISIG, narcotisation par l'alcool. . 17
EISMOND, étude des Infusoires . . 466
ELOUI, éosine 156
ELSCHNIG, inclusion à la celloïdine. 220
EMERY, masse d'injection. 309
ENGELMANN, étude de l'épithélium cilié. 443
ENTZ (GEZA), étude des Infusoires. 469
ERLICKI, liquide d'. 45
ERMENGEM (VAN) cils et flagella . . 471
ERRERA, nigrosine. 138
ETERNOD, anneaux histologiques . 164
EULENSTEIN, lut d' 283
EVERARD, DEMOOR et MASSART, hématoxyline éosique 182
EXNER, coloration de nerfs par l'osmium 419
— durcissement des centres nerveux. 402
EYCLESHEIMER, coupes en séries. . 245
— inclusion à la celloïdine . 222, 228 229

F

FABRE-DOMERGUE, Infusoires. . . . 468
— sirop de glucose. 267
FAJERSTAJN, langue de la Grenouille 372

Pages.
FARRANT, médium conservateur. . 266
FAUSSEK, liquide de FLEMMING. . . 37
FEIST, bleu de méthylène 152
FERRERI, labyrinthe 384
FERRIER, liquide additionnel pour le sang 433
FICK, imprégnation de GOLGI. . . 392
FIELD et MARTIN, collodion de Schaellibaum. 239
— inclusion à la paraffine . . 201, 206
— inclusion double. 230
FISCHEL, cylindres d'axe 396
FISCHER, corpuscules tactiles. . . 370
— étude des Trématodes. . 450
— inclusion au savon . . . 450
— plaques motrices 377
— teinture d'éosine. . . . 156
FISCHER (A.), granules cytoplasmiques 365
FISH, décalcification 319, 321
— durcissement de centres nerveux. 405
— essence de thym pour éclaircissement de coupes à la celloïdine 227
— inclusion à la celloïdine . . 229
FLECHSIG, chlorure d'or. 173
— imprégnation au sublimé de GOLGI 412
— modification de l'hématoxyline de WEIGERT. 419
FLEMMING, acide chromo-acétique. 34
— acide chromo-acéto-osmique 35, 38
— acide picro-osmique . . 57
— agents fixateurs pour la cytologie . . 359 et suiv.
— cellules caliciformes. . 437
— critique de l'emploi des sels de chrome en cytologie 360
— division de l'œuf des Échinodermes 355
— glandes caliciformes . . 437
— — mucipares. . . 436
— graisse osmiquée . . . 40
— inclusion au savon. . . 216
— injection de Mollusques acéphales 442
— liquide de. 35, 38
— — mélange faible. . 35
— — — fort 38
— mélange conservateur . 8
— méthodes cytologiques. 353
354, 355, 359

Digitized by Google

Pages.
FLEMMING, méthodes de coloration en cytologie. 129 et suiv.
— méthode à l'orange . . 184
— tissu osseux décalcifié. 430
— solution de damar. . . 277
— — safranine . 129
— — gentiane. . 131
— — dahlia. . . 132
— tissu adipeux 424
— — conjonctif 424
— vessie de la Salamandre. 380
— yeux de Gastéropodes . 442
FLESCH (MAX), coloration des centres nerveux . . 407
— colorations combinées. 181
— éclaircissement de coupes à la celloïdine. 228
— limaçon. 384
— mélange fixateur et durcissant. . . . 35
— modification du procédé de coloration de WEIGERT par l'hématoxyline. 413, 416
— préparation à sec de centres nerveux. 422
— sang 434
FLOEGEL, méthode pour coller les coupes 243
FLORMAN, inclusion à la celloïdine. 225
FOA, sang. 436
FOETTINGER, méthode de narcotisation 17
— préparation de la paraffine pour inclusions 214
FOL, albumine pour coller les coupes. 241
— alcool absolu.. 62
— baume de Canada 274
— collage de coupes. . . 241, 244
— collage d'étiquettes sur le verre.. 473
— décalcification. 321
— étuve à paraffine.. 204
— gélatine pour coller les coupes. 244
— gelée à la glycérine.. . . . 272
— inclusion dans le vide. . . 204
— masses d'injection. 296
300, 301, 303
— mélange chromo-acéto-osmique. 36

Pages.
FOL, métagélatine 303
— méthode de narcotisation. . 19
— méthodes de fixation . 35, 40, 60
— nettoyage des porte-objets et lamelles 472
— orseille. 111
— perchlorure de fer pour fixation 53
— picro-carmin. 86
— reconstruction de coupes . . 329
— ribésine 113
— styrax 279
FOSTER et BALFOUR, embryologie des Oiseaux. 337
FRANCOTTE, carmin à l'acide borique 91
— inclusion dans le vide. 204
— « Schnittstrecker ». . . 209
FREEBORN, acide carminique pour centres nerveux. . . 410
— picronigrosine. . . . 138
— tissu conjonctif. . . . 424
FRENZEL, liquide fixateur. 51
— méthodes pour coller les coupes. 242, 245
FREUD, imprégnation des centres nerveux par l'or. 422
FREY, masse d'injection.. 302
— sérum iodé artificiel. . . . 260
FRIEDLAENDER, mélange fixateur. . 46
FROMMANN, vert de méthyle. . . . 140
FUSARI, imprégnation de GOLGI. . 390

G

GAGE, alcool picrique 57
— décalcification. 321
— liquide additionnel.. 264
— mélange éclaircissant . . 257
— mélange macérateur. . . . 314
— méthodes pour coller les coupes.. . . . 239, 243, 245
— picro-carmin.. 86
— et SMITH, « Schnittstrecker » 209
GALEOTTI, colorations « vitales ». 73
GALLEMAERTS, coupes en séries. . 240
GALLI, nerfs. 396
GANNAL, solution de 261
GARBINI, coloration à la safranine. 130
— colorations combinées. . 185
— fixation des Alcyonaires. 459
— narcotisation d'Holothurides.. 455
— nettoyage de lamelles et porte-objets. 472

Digitized by Google

Pages.
GAULE, méthodes pour coller les coupes. 236
GAY-LUSSAC, tableau pour diluer l'alcool. 61
GEBERG, corpuscules de Herbst et de Grandry. 371
— imprégnation par l'or. . 173
— imprégnation de GOLGI. . 390
GEDOELST, méthodes de digestion. 318
— nerfs à myéline. 396
GEHUCHTEN (VAN), œuf d'*Ascaris*. . 365
GEHUCHTEN, ganglions sympathiques, imprégnation de GOLGI . . 389
GELPKE, hématoxyline de WEIGERT. 414
GERLACH, embryologie des Oiseaux 336
— imprégnation des centres nerveux par l'or. . . 422
— inclusion à la gélatine. . 217
— masse d'injection. . . . 297
— nerfs des muscles de la Grenouille. 376
GIACOMINI, préparation à sec de l'encéphale entier. 422
GIBBES, carmin au borax. 87
— colorations combinées. . 181
— nettoyage de lamelles et porte-objets. 472
GIERKE, carmin à l'ammoniaque. . 87
— coloration des centres nerveux. 408
— étude de la névroglie. . . 422
— macérations. 314
GIESBRECHT, méthode pour coller les coupes. 240
— « Schnittstrecker ». . 209
GIESON (VAN), coupes à la celloïdine. 228
— essences éclaircissantes. 256
— formol. 66
GILSON, blanchiment. 325
— formol 65
— gelée au chloral. 273
— liqueur conservatrice. . . 263
— liquide fixateur. 50
— méthodes cytologiques. . 365
— spermatogenèse des Arthropodes. 365
GOADBY, liqueur de. 263
GOETTE, œufs d'Amphibiens . . . 342
GOLGI, corpuscules de. . 377 et suiv.
— imprégnation au chromate d'argent. 385 et suiv.;
— — la *Méthode lente* . . 386
— — la *Méthode rapide* . 387
— — critique de cette méthode. 387

Pages.
GOLGI, imprégnations, variantes du détail de l'imprégnation. . . 388 à 391
— — variantes concernant la conservation des pièces. . . . 391 à 393
— imprégnation double de RAMÓN Y CAJAL. 388
— imprégnation au sublimé. 410
— — variantes. 411
GORONOWITSCH, embryologie des Poissons osseux. 344
GRAF (A.), Hirudinées 455
GRAFF (VON), Rhabdocœles. . . . 448
GRAM, coloration de microbes dans les tissus 132
GRANDRY, corpuscules de. 371
GRASER, méthode de coloration. 137, 143
GRAVIS, coupes en séries. 244
GRAY, coupes en séries. 244
GRENACHER, carmin alcoolique. . . 90
— — aluné. 81
— — au borax neutre. 87
— — — alcoolique. 87
— dépigmentation. . . . 324
— hématoxyline dite de. 101
— huile de ricin comme milieu conservateur 279
— purpurine de. 110
— yeux de Céphalopodes. 443
GREPPIN, imprégnation de GOLGI. 392
GRIEB, carmin aluné. 82
GRIESBACH, colorations diverses . 157
192
— masses d'injection. . 310
— rose Bengale. 156
— sang. 434
— tissu élastique. . . . 428
— vert d'iode. 141
— vert de méthyle. . . 139
GROBBEN, embryologie de *Moina*. 349
GRÜBLER, adresse. 76
GSCHEIDLEN, préparation de muscles lisses. 380
GUIGNET, masse d'injection. . . 300
GULLAND, coupes en séries. . . . 237

H

HACHE, hématoxyline 103
HÆNTSCH, liquide de. 270
HALLER (BÉLA), liquide macérateur. 315
HALLIBURTON, microchimie de la cellule. 357
HAMANN, carmin de. 87
— étude des Astérides. . . 456

Digitized by Google

Pages.
HAMILTON, durcissement du cerveau 403
— inclusion par congélation 234, 406
HANAMAN, nettoyage de lamelles et porte-objets. 472
HANSEN, hématoxyline 100
HARNER, imprégnation d'animaux marins 168
HARTIG, masse d'injection . . . 302
HARTING, liquide de 50
— mastic 284
HASWELL, différenciateur de . . . 6
HATCHETT JACKSON, éclaircissement. 252
HAUG, carmin-borax 87
— hématoxyline 103
— hématoxyline pour nerfs. . 419
— phloroglucine 322
HAYEM, sang 432, 434
HEIDENHAIN (M.), coupes en séries . 238
— fuchsine acide . . 155
— hématoxyline à l'alun de fer. . . . 107
— inclusion à la paraffine 201
— mélange EHRLICH-BIONDI. 186
— mélange triacide . 189
— méthodes cytologiques 353
HEIDENHAIN (R.), carmin de. . . 87
— glandes. 438
— hématoxyline de . 105
HEIDER, collodionnage de coupes fragiles 212
HENCHMAN, embryologie de la Limace 346
HENKING, collodionnage de coupes fragiles. 212
— embryologie des Arthropodes 347, 349
HENNEGUY, carmin aluné 82
— déplissement de coupes. 210
— embryologie de *Helix*. 346
— embryologie des Poissons osseux. 342 et suiv.
— étude des Infusoires. 466, 468
— mordançage par le permanganate 133
HENNEGUY et VIGNAL, microtome à bascule 195
HÉNOCQUE, chlorure d'or 173
HERBST, corpuscules de. 371
HERLA, œuf d'*Ascaris*. 365
HERMANN, coloration plasmatique à l'hématoxyline. . . 364

Pages.
HERMANN, formol 65
— imprégnation par l'osmium 175
— mélange platino-acéto-osmique. 53, 361
— papillæ foliatæ. 372
HERMANN et BŒTTCHER, méthode de coloration 122
HERTWIG, embryologie de la Grenouille. 340
— — du Triton. 342
— étude des Actinies. . . 458
— — des Méduses. . . 462
— fécondation de *Strongylocentrotus*. 365
— fumigation de tabac . . 16
— liquide macérateur. . . 315
— nitrate d'argent pour animaux marins. 165, 168
— ovules de la Grenouille. 365
HERXHEIMER, tissu élastique . . . 428
HEURCK (VAN), styrax. 279
HEYDENREICH, vernis à l'ambre . . 286
HEYMONS, embryologie des Blattides 349
HEYS, baume de Canada. 276
HICKSON, hématoxyline et éosine. 182
— liquide macérateur . . . 313
— yeux des Arthropodes . 446
HIS, imprégnation de la cornée . 372
HIROTA, embryologie des Oiseaux. 339
HOFER, narcotisation. 18
HOFFMANN, blastoderme du Poulet. 337
— inclusion dans le vide. 204
HOGGAN, anneaux histologiques . 164
— nitrate d'argent. 165
— perchlorure de fer pour imprégnations 176
HOLL, toluène pour inclusions . . 201
HOYER, carmin à l'ammoniaque . 87
— carmin sulfurique 91
— chlorure d'or. 173
— masses d'injection. . 291, 295, 299, 301, 302, 310
— médium conservateur. 265, 266
— mucine. 436
— nitrate d'argent 166
— picro-carmin 86
HOYER (jun.), formol 66
HUBER, imprégnation de GOLGI . . 392
— nerfs. 396
HYATT, méthode d'inclusion . . . 232

I

IDE, épithéliums. 368

Digitized by Google

Pages.
IGACUSCHI, méthode de l'or pour le foie 437
IJIMA, embryologie des Planaires . 350
ISRAEL, orcéine 111

J

JACOBS, inclusion par congélation. 234
JACKSON, HATCHETT, éclaircissement 252
JACQUET, injection de Sangsues. . 455
JADASSOHN, cellules plasmatiques. 428
JAKIMOVITCH, cylindres-axes. . . . 396
— nitrate d'argent. . . 167
JÆGER, liquide de 270
JAMES, nettoyage de lamelles et porte-objets. 473
JANSSENS, bleu carmin 160
JELGERSMA, coloration des centres nerveux. 408
JELINEK, extraction d'acide picrique 55
— inclusion à la celloïdine. 226
JENSEN, étude des Infusoires. . . 466
JOHNSON L., conservation et insolation de solutions de sels métalliques. 163
— imprégnation par l'or. 170
— inclusion à la paraffine. 206
— — à la celloïdine. 226
— mélange durcissant . 45
— rétine 382
JOLIET, inclusion à la gomme. . . 231
JOSEPH, masse d'injection 305
— théorie des imprégnations. 162
JULIEN, cils et flagella 471
— lut. 285

K

KADYI, inclusion au savon 215
KAES, hématoxyline de KULTSCHITZKY 418
KAISER, centres nerveux 409
— inclusion à la gélatine . . 217
— modification de l'hématoxyline de PAL. 417
KALLIUS, imprégnation de GOLGI. 389, 393
— rétine. 382, 389
KASTSCHENKO, reconstruction de coupes 330
KEISER, Acanthocéphales 451
— liquide de 48
KEMP, conservation des « plaquettes » de Bizzozero. 433

Pages.
KENT (S.), études des Infusoires. 60, 470
KINGSLEY, gomme-laque pour coller les coupes 240
— inclusion dans la paraffine. 196
KIONKA, embryologie des Oiseaux. 338
KISHINOUYE, embryologie des Araneina 349
KITTON, lut au bitume de Judée. . 283
— styrax 279
KLEBS, inclusion dans la gélatine. 217
KLEIN, imprégnation de la cornée. 372
— mélange fixateur 34
KLEINENBERG, colophane 273
— embryologie du Lombric 349
— hématoxyline de . . 104
— liquide de 55
KLEMENSIEWICZ, picro-carmin . . . 86
KOCH (V.), méthode d'inclusion . 232
KOGANEI, préparation de l'iris . . 379
KÖLLIKER, ovules de la Lapine. . . 332
KOLOSSOW, imprégnation par l'or. 173
— — par l'osmium. . 176
— mélange osmique . . . 30
— régénération de l'osmium réduit 28
KOLLMANN, embryologie des Poissons 343
KOPPEN, tissu élastique 429
KOROTNEFF, prép. des Siphonophores 16
KORYBUTT-DASZKIEWICZ, cellules plasmatiques 426
KOSSEL, microchimie de la cellule. 358
KOSSINSKI, coloration combinée. . 185
KOTLAREWSKY, durcissement de centres nerveux. . . 402
— liquide de FLEMMING. 38
KRAUSE, corpuscules de. 371
— molybdate d'ammonium. 177
— plaques motrices 377
— rétine. 383
— vert thiophène 157
KRAUSS, nitrate d'argent. 167
KROMAYER, fibrilles d'épithéliums. 368
KRÖNIG, lut 285
KRONECKER, sérum artificiel. . . . 260
KRYSINSKY, inclusion à la photoxyline. 219
KÜHNE, liquide digestif. 318
— mélange macérateur . . . 316
— méthode de coupes par congélation. 235
— plaques motrices. 377
KUHNT, nerfs à myéline 395
— rétine 382

Digitized by Google

Pages.
KÜKENTHAL, narcotisation d'Annélides 17, 453
— vaisseaux sanguins d'Annélides 454
KULTSCHIZKY, inclusion double . . 230
— liquides conservateurs. 8
— mélange fixateur . . 44
— modification de l'hématoxyline de WEIGERT. 418
— névroglie 422
— œufs d'*Ascaris*. . . . 365
— Rubin S. 154, 422
KUPFFER, cylindre de l'axe 396
— embryologie des Poissons osseux . . 344
— — des Reptiles. 339
— étude du foie. 437
KUSKOW, liquide digestif. 317

L

LACHI, formol 67
LAMANSKY, lumière verte pour l'éclairage microscopique 444
LANDOIS, mélange macérateur. . . 313
LANG, étude des Planaires 448
— liquide de. 49
— méthodes de fixation . 49, 51
LANGERHANS, macération du tissu musculaire 375
— médium conservateur 266
LANGHANS, coloration double par l'hématoxyline. 97
LANKESTER et BOURNE, yeux de Limule. 446
LAVDOWSKY, bleu de méthylène. . 151
— éosine 156
— formol. 65
— limaçon. 384
— liquide conservateur au chloral. . . 261
— — macérateur. 313
— myrtillus 113
— résine Sandaraque. . 280
— sang 436
LAWRENCE, gelée à la glycérine. . 271
LEBER, bleu de Prusse pour l'imprégnation 177
LEE, BOLLES, acide osmique et pyrogallol. 174
— baume de SEILER. . . 276
— bleu Victoria et fuchsine acide 185

Pages.
LEE, BOLLES, bleu Victoria 133
— colophane 275
— essence de bois de cèdre. 254
— formol. 67
— Hirudinées. 454
— inclusion à la paraffine. 202
— — à la celloïdine . 229
— inversion des colorations de RAWITZ . . 136
— jus de citron comme fixateur 20
— montage de préparations liquides . . . 282
— Némertiens. 449
— pratique des éclaircissements 252
— safranine et Kernschwarz. 112
— sur l'albumine de MAYER. 241, 242
LEGAL, carmin picro-alunique . . 83
LEGROS, nitrate d'argent. 167
LENDENFELD (VON), Éponges. . . . 465
LENHOSSÉK (VON), langue du Lapin. 372
— limaçon. 384
— nerfs d'Annélides. 454
LENNOX, rétine. 383
LÉON, francéine 160
— nucine 113
LETELLIER, masse d'injection. . . 308
LEWIS (B.), centres nerveux, coloration. 408
— centres nerveux (durcissement des). 403
— centres nerveux (demi-éclaircissement de coupes de). 422
— centres nerveux (masses d'inclusion pour) 406
— préparations des centres nerveux par compression. . 422
LIEBERMANN, composition du carmin. 77
LILIENFELD, sang. 436
LILIENFELD et MONTI, microchimie de la cellule. 359
LINDSAY, JOHSON, voyez JOHNSON.
LISSAUER, modification de l'hématoxyline de PAL 418
LIST, cellules glandulaires 438
— — mucipares 437
— colorations combinées . . . 182
183, 190, 191
— étude des Coccides. 445
— ramollissement de la chitine. 445
LOCY, embryologie de l'*Agelena* . 349

Digitized by Google

Pages.
LOEFFLER, cils et flagella. 470
LÖNNBERG, cytologie de l'Escargot. 353
— *Triaenophorus* 450
LŒWE, préparation du cristallin. 374
LOEWENTHAL, picro-carmin 86
LŒWIT, chlorure d'or 171
LŒWY, liquide pour le sang . . . 434
— macération d'épithéliums. 368
LONGWORTH, corpuscules de Krause. 371
LOOSS, éclaircissement de la chitine 318
— étude des Nématodes. 318, 451
LUGOL, solution de. 60
LUSSAC (GAY), tableau des alcools. 61
LUSTGARTEN, bleu Victoria 133
— tissu élastique. . . 428
LUYS, color. de centres nerveux. 408

M

MACALLUM, carmin et carmin d'indigo. 180
MAC BRIDE, *Amphiura squamata*. . 458
MAGINI, imprégnation de centres nerveux. 412
MÆHRENTHAL (VON), imprégnation par l'osmium 176
MALFATTI, microchimie de la cellule. 358
MALLORY, hématoxyline à l'acide phosphomolybdique 410
MANFREDI, imprégnation par l'or. 173, 378
MANN, bleu de toluidine 139
— coupes en séries. 242
— d'EHRLICH 102
— fixation de centres nerveux 400
— hématoxyline de DELAFIELD. 101
— liquides fixateurs 30, 52
— Wasserblau 159
MARCHI, corpuscules de GOLGI. . . 378
— nerfs dégénérés 394
— préparation de Mollusques 442
MARK, collodionage de coupes fragiles. 212
— embryologie de la Limace. 346
— gomme-laque pour coller les coupes. 240
MARSCHALKÒ, cellules plasmatiques 428
MARSH, dépigmentation et blanchiment 323
— liquide décalcifiant 328
— lut de gelatine 282
MARSHALL, plaques motrices . . . 377
MARSHALL (M.), embryologie de Plagiostomes 344
MARTIN, benzoazurine. 138
MARTINOTTI, baume de Canada . . 277

Pages.
MARTINOTTI, coloration des centres nerveux 408, 409
— colorations doubles. . 182
— colorations « vitales ». 72
— damar 278
— picro-nigrosine. . . . 138
— tissu élastique. . . . 428
MARTINOTTI et RESEGOTTI, coloration à la safranine 130
MASON, durcissement de centres nerveux 405
MAURICE et SCHULGIN, embryologie des Tuniciers 345
MAYER, PAUL, albumine pour coller les coupes. . . . 241
— Arthropodes. 444
— bain-marie 204
— baume du Canada. . 276
— Carmalun 80
— carmin à l'ammoniaque. . . . 87
— — alcoolique. . 90
— — au chlorure d'aluminium 81
— Cochenille 79, 89
— collage de coupes 240, 241
— dépigmentation et blanchiment. . . . 323
— désilicification . . . 323
— fixations. . . . 55-57, 63
— gomme laque 240
— hémacalcium 103
— hématéate d'ammoniaque 94
— hémalun 98, 99
— — alcoolique. . 104
— hématoxyline de KLEINENBERG 104
— masse d'injection . . 308
— paracarmin 88
— picro-carmin. 86
— principes de technique. 11
— résines et baumes. . 275
— Schnittstrecker . . . 209
— théorie du carmin. . 77
— — de la cochenille. . . . 79
— — de l'hématoxyline. . . 92
— vert de méthyle . . . 140
MAYER, S., bleu de méthylène. 148, 150, 153
— violet B. 158, 423
MAYS, terminaisons nerveuses dans les muscles 377
MAYZEL, brun Bismarck 142

Digitized by Google

Pages.
MEISSNER, corpuscules de. 371
MERCIER, bleu d'aniline. 158
— coloration de nerfs par l'hématoxyline 419
— imprégnation de GOLGI. . 410 note
MERK, liquide de FLEMMING 38
MERKEL, demi-éclaircissement de coupes de centres nerveux. 422
— inclusions à la celloïdine 219
— liquide durcissant. . . . 42
— mélange de carmin boracique et carmin indigo 180
— molybdate d'ammonium 177
METCALF, embryologie de Chiton . 347
MEYER, liqueurs conservatrices . 265
MIBELLI, tissu élastique. 428
MIGULA, sérum glycérique 260
MILNES MARSHALL, embryologie des Plagiostomes 344
MINOT, carmin picrique. 87
— éclaircissement de coupes à la celloïdine 227
— hématoxyline. 110
— macération d'épithéliums. 368
MITCHELL, hématoxyline de . . . 103
MITROPHANOW, épithélium . . . 368
— organes sensitifs d'Amphibiens (Wasserblau). 372
— Wasserblau 159
MITSUKURI, embryologie des Reptiles 339
MŒBIUS, mélanges macérateurs . 314
MŒRNER, cartilage. 432
MOLESCHOTT, potasse caustique pour macérations 313
MOLESCHOTT et PISO BORME, liquide macérateur 312
MONDINO, chromate d'argent de GOLGI 388
MONTI, imprégnation au sulfate de cuivre. 412
MOORE, préparation du sang. . . 435
MORGAN, embryologie de la Grenouille . . . 340
— — de *Periplaneta*. 347
MOSELEY, yeux des Chitonides . . 443
MOSSO, sang. 434
MÜLLER, liquide de 44
— masse d'injection 308
— nitrate d'argent. 166
MÜNDER, adresse. 76

N

NANSEN, macérations. 314
NATHUSIUS, poils et ongles 369
NEALEY, os et dents, non décalcifiés. 429
NEELSEN et SCHIEFFERDECKER, agents éclaircissants . . . . . 253 et suiv.
NEGRO, plaques motrices 377
NESTEROFFSKY, chlorure d'or . . . 173
NICOLLE et CANTACUZÈNE, oxychlorure de ruthénium 177
NIETZKI, hématéine. 92
NIKIFOROW, carmin borax. 87
— coloration de centres nerveux 421
— éclaircissement de coupes à la celloïdine . 227
NISSEN, méthode de coloration. . 132
— noyaux des cellules lactogènes 365
NISSL, colorations de centres nerveux 421
NOLL, liquides corrosifs 318
— médium conservateur. . . 265
— squelette d'Éponges siliceuses 466
NORDMANN, cellules plasmatiques . 426
NORRIS et SHAKESPEARE, carmin et carmin d'indigo 180

O

OBERSTEINER, durcissement de centres nerveux 401
OBREGIA, coupes en séries 249
— imprégnation de GOLGI . 392
ODENIUS, liquide macérateur . . . 316
OGATA, centres nerveux 402
OHLMACHER, mordançage par la formaline. 135
— précipités de safranine produits par l'iode ou l'acide picrique . 130
OPPEL, foie 438
— imprégnation de GOLGI . . 391
OPPITZ, nitrate d'argent 167
ORTH, carmin au lithium. 86
— carmin picrolithique . . . 179
— violet de méthyle 142
OVERTON, blanchiment 31
— fixation par l'iode . . . 60
OVIATT et SARGENT, injections. . . 290
OWEN, liqueur conservatrice . . . 263
OYARZÜN, cerveau, imprégnation de GOLGI 389

P

PACINI, liqueurs conservatrices. 261-262
— liqueur de 50

Digitized by Google

Pages.
PAGENSTECHER, liqueur de 50
PAL, hématoxyline. 416
PALADINO, imprégnation au palladium 393
PANETH, hématoxyline de WEIGERT. 415
PANSCH, masse d'injection 310
PARKER, bleu de méthylène . . . 152
— lut à la térébenthine de Venise 284
— yeux d'Arthropodes . . . 446
PARKER et FLOYD, formol. 474
PARTSCH, cochenille 83
PATTEN, embryologie des Phryganides 348
— inclusion à la paraffine. . 205
— macérations de Mollusques 444
— yeux de *Pecten* 443
PEREMESCHKO, méthodes cytologiques 353
PERENYI, liquide de 41
— méthode embryologique. 339
PERGENS, picro-carmin 86
PERLS, carmin. 87
PERRIER, Annélides. 453
PFITZER, inclusion au savon . . . 216
— nigrosine. 138
PFITZNER, méthode de coloration
— pour les noyaux . . . 365
— safranine de. 129
— solution de damar. . . 278
PHILIPPSON, liquide macérateur. . 368
PIANESE, bleu de méthylène et éosine. 191
— tissu conjonctif 424
PICTET, liquide additionnel. . . . 355
— spermatogenèse 365
PIERSOL, embryologie de Mammifères 335
PINTNER, Ténias 450
PISENTI, carmin aluné 82
PISO BORME et MOLESCHOTT, liquide macérateur 312
PLATNER, Echtgrün pour nerfs . . 396
— Kernschwarz 155
PODWYSSOZKI, coloration à la safranine 130
— mélange fixateur . . 39
POELZAM, inclusion au savon . . . 216
POLAILLON, perchlorure de fer. . . 176
POLI, coupes en séries 245
— inclusion au savon. . . . 216
POLITZER, oreille interne. 384
POUCHET, dépigmentation . . . 324
PREVANT, coloration à la safranine. 130
— oreille interne. 384

Pages.
PRINGLE, appareil à inclusion. . . 205
— coupes en séries 237
PRITCHARD, solution de. 173
PRITCHARD (URBAN), limaçon. . . . 384
— liquide de. 34
PRUDDEN, hématoxyline dite de. . 101

Q

QUERVAIN (DE), fixation de centres nerveux. 400

R

RABL, cochenille. 83
— embryologie d'Amphibiens. 342
— des Poissons osseux. 328
— lignes de FROMMANN. 396
— liquides fixateurs . . 35, 52, 328
— safranine et hématoxyline. 185
— traitement de coupes fragiles 212
RAMÒN Y CAJAL, voyez CAJAL.
RANSOM, imprégnation d'animaux marins 168
RANVIER, acide chlorhydrique pour décalcification 321
— alcool absolu, préparation 62
— alcool au tiers pour macérations. 312
— — — pour fixations. . 63
— carmin à l'ammoniaque. 87
— carmin neutre 87
— chlorure d'or. . . . 172, 174
— clasmatocytes 474
— corpuscules de GOLGI. . 377
— — tactiles. . . 370
— coupes d'épithéliums . . 367
— foie 437
— autres glandes. 438
— hématoxyline de 101
— imprégnation de la cornée. 163, 372
— macérations. 314, 316
— masses d'injection . 293, 297, 307, 308
— ménisques tactiles . . . 370
— méthodes de fixation. . 30
— nerfs à myéline 395
— nerfs intra-épidermiques. 370
— nitrate d'argent. . . 163, 165
— os non décalcifiés. . 429, 431
— picro-carmin 85, 86
— plaques motrices. . . . 376

Digitized by Google

Pages.
RANVIER, poils tactiles 371
— purpurine 110
— quinoléine 158
— rétine 381
— sérum iodé. . . 259, 260, 311
— vessie de la Grenouille . 379
— et VIGNAL, mélange fixateur 30
RAWITZ, imprégnation de GOLGI. . 410 note.
— mélange triacide d'EHRLICH. 190
— mordançage au tannin et au tartre stibié 135
RECKLINGHAUSEN, nitrate d'argent . 165, 166
REDDING, imprégnation par l'or. . 174
REDENBAUGH, narcotisation 18
REHM, coloration de centres nerveux 407, 409, 421
REICH, nitrate d'argent. 165
REICHENBACH, embryogénie de l'Écrevisse. 349
REIMAR, formol. 66
REINBACH, mélange triacide d'EHRLICH. 189
REINKE, coloration à l'orange de FLEMMING 184
— lysol 316
— tissus cornéfiés 370
REMAK, liquide durcissant 342
RENAUT, hématoxyline. 102
— hématoxyline éosique. . 181
— imprégnation de la cornée. 373
RESEGOTTI, coloration à la safranine 130
— coloration par substitution 125, 192
— marques de safranine. 128
RETTERER, injections naturelles. . 310
— muscles lisses. . . . 379
— œufs de Lapine 333
RETZIUS, bleu de méthylène. . 148, 150
REZZONICO, nerfs à myéline. . . . 396
RICHARD, méthode de narcotisation. 18
RIPPART et PETIT, liqueur de . . . 59
RINDFLEISCH, macération du cerveau 315
RITTER, embryologie des Diptères. 349
ROBERTSON, inclusion à la dextrine. 232
ROBIN, masses d'injection, 291-293, 306, 308, 310
ROBINSKI, nitrate d'argent 165
ROBOZ (ZOLTAN VON), carmin aluné. 83
RŒSSLER, étude des Phalangides . 447

Pages.
ROLLETT, Carminroth. 87
— couples de muscles striés. 375
— imprégnation de la cornée. 373
— inclusion par congélation 235
— liquide macérateur. . . 314
ROMITI, blastoderme du Poulet . . 337
ROSIN, centres nerveux. 409
ROUGET, bleu de méthylène. . . . 148
— nitrate d'argent. . . 165 167
ROUSSELET, Rotifères. 452
RUNGE, inclusion au blanc d'œuf. 235
RUTHERFORD, picro-carmin. . . . 86
RYDER, inclusion double. 230

S

SACERDOTTI, imprégnation de GOLGI. 390
SACHS, modification de l'hématoxyline de PAL. 418
SAEFFTIGEN, Échinorhynques. . . . 451
SAHLI, baume de Canada 277
— colorations spécifiques des centres nerveux 420
— durcissement de centres nerveux 399, 400
SALA, méthode rapide de GOLGI. . 390
SALENSKY, inclusion au savon. . . 216
SAMASSA, coupes de Cténophores . 464
— imprégnation de GOLGI. 391-392
SANFELICE, hématoxyline. 103
SANKEY, coloration des centres nerveux. 408
SANTORIUS, étuve thermostatique. 204
SARASIN, embryogénie des Reptiles 339
SARGENT, dépigmentation. 324
SATTLER, nitrate d'argent. 187
SAZEPIN, antennes des Chilognathes. 445
SCHAEFER, cellule musculaire. . . 375
— modification de l'hématoxyline de PAL. . . 417
SCHÆLLIBAUM, mélange pour coller les coupes. 238
SCHAFFER, névroglie. 422
— reconstruction de coupes 330
— rétine 383
— tissu osseux 429 430-431
SCHENK, méthode de fixation. . . 59
SCHIEFFFERDECKER, agents éclaircissants 253 et suiv.
— cellules muci-pares 437

Digitized by Google

Pages.
SCHIEFFFERDECKER, cellule musculaire. 375
— colorations combinées. 191
— coupes en séries 237
— imprégnation des centres nerveux par le chlorure de palladium . 422
— imprégnation par l'or 422
— inclusions à la celloïdine 219
— liquide digestif . 318
— masses d'injection. 309
— mélange macérateur. 316
— rétine 382
— sang. 436
— tissu nerveux . . 396
SCHLEICHER, méthodes cytologiques 354
SCHMAUS, blue-black pour centres nerveux. 408
— carmin à l'urane. . . . 87
— carmin à l'urane, do. . 410
SCHMIDT, embryologie des Pulmonés. 347
SCHOLTZ, rouge Congo. 72
SCHNEIDER, carmin de. 84
SCHOTTLAENDER, méthodes cytologiques. 365
SCHULGIN, embryogénie des Tuniciers. 345
— masses d'inclusion. . . 215
SCHULTZE (MAX), acétate de potassium (liquide conservateur) 261
— liquide macérateur. . . 316
— macération de la rétine. 383
— sérum iodé. 259
SCHULZE (F.-E.), embryogénie des Éponges 351
— épithéliums. 367
— Pennatulides 460
— « Schnittstrecker » . . 209
SCHÜRMAYER, narcotisation d'Infusoires 467
SCHWALBE, dissociation de muscles lisses. 379
— limaçon. 383
— théorie des imprégnations. 162
SCHWARZE, conservation de Cercaires. 451
SCHWEIGGER-SEIDEL, carmin de. . 87

Pages.
SCOTT et OSBORN, embryogénie du Triton. 341
SEAMAN, gelée à la glycérine. . 272
SEELIGER, larves de Crinoïdes. . 458
SEGALL, nerfs. 396
SEHRWALD, imprégnation de GOLGI. 390, 391, 393
SEILER, baume de Canada. . . . 276
— carmin et carmin d'indigo, 179
— nettoyage de lamelles et porte-objets 472-473
SELENKA, embryogénie des Échinodermes. 351
— inclusion au blanc d'œuf 235
— orientation d'objets dans la paraffine. 199
SIEBENMANN, labyrinthe. 384
SMIRNOW, corpuscules tactiles. . 371
— imprégnation de GOLGI. 390
SOLGER, sarcolemme. 375
SOLLAS, inclusion par congélation. 234
SOMMER, étude de *Macrotoma plumbea*. 447
SOULIER, mélange dissociateur. . 474
SOUZA (DE), pyridine. 64
SPEE (GRAF), préparation de la paraffine. 214
SPEK (VAN DER), cellules plasmatiques. 428
SQUIRE, ammoniated hematoxyline. 100
— chlorure d'or 170
— essence d'origan 256
— gelée à la glycérine . . . 272
— hématoxyline de Kleinenberg. 105
— picro-carmin. 86
— solution de damar . . . 278
— vert de méthyle. 140
STEPHENSON, milieu conservateur. 273
STIEDA, études sur les agents éclaircissants 252
— mastic blanc. 287
STIRLING, colorations combinées 181, 183
STÖHR, coloration combinée. . . 182
STRAHL, embryogénie des Reptiles. 339
STRASBURGER, méthodes cytologiques 365
— vert de méthyle. . . 140
STRASSEN, ZUR, *Bradynema*. . . 451
STRASSER, coupes en séries. . . . 239
— Schnittstrecker 209
STRICKER, inclusion à la gomme. 231
STROEBE, coloration de centres nerveux. 421
STRONG, formol. 66

Digitized by Google

Pages.
SUCHANNEK, collage de coupes en séries 237
— essence de bergamote. 255
— huile d'aniline. . . . 257
— térébenthine de Venise. 279
SUMMERS, méthodes pour coller les coupes. 239, 245

T

TAFANI, limaçon 384
TAENZER, tissu élastique. 428
TAGUCHI, masse d'injection. . . . 308
TAIT (LAWSON), chou rouge. . . 113
— tournesol. 113
TAL, imprégnation au sublimé de GOLGI 411
TARTUFERI, cornée. 374
TEICHMANN, masse d'injection. 302, 310
THANHOFFER, v. préparation du sang. 435
THIN, coloration du sang. 435
— dissociation de la rétine. 312, 383
THIERSCH, carmin au borax . . . 91
— — d'indigo 110
— masses d'injections. 297 299 300, 302
THOMA, inclusion au blanc d'œuf. 235
THRELFALL, méthode pour coller les coupes. 245
TIRELLI, nerfs. 396
TIZZONI, carmin aluné 82
— coupes d'épithéliums. . 366
— nerfs à myéline. 395
TOISON, préparation du sang. . . 433
TOLOTSCHINOFF, vessie de la Grenouille 380
TOURNEUX et HERMANN, nitrate d'argent 165, 367
TRENKMANN, cils et flagella. . . . 471
TRZEBINSKI, centres nerveux. . . 402
TULLBERG, narcotisation 18
TURNBULL, bleu de. 307

U

ULIANIN, embryologie d'*Orchestia*. 349
UNNA, blanchiment. 33
— coloration d'épithéliums (Wasserblau-Orcéine) . . 369
— hématéine. 92
— orcéine et Wasserblau. . . 424
— Plasmazellen et Mastzellen. 427
— solution constante. 95
— substance collagène. . . . 424

Pages.
UNNA, tissu élastique. 428
UPSON, carmins pour centres nerveux. 410
— méthodes au chlorure d'or. 422
URBAN-PRITCHARD, liquide de. . . 34
USKOFF, méthodes cytologiques. 365
— méthode de fixation. . . 40
USSOW, embryologie des Céphalopodes. 345

V

VAN BENEDEN, alcool acétique. . . 58
— Ascidies composées. 440
— embryogénie du Lapin 333
— embryogénie des Ténias. 350
— œuf d'*Ascaris*. . . 365
VAN DER SPEK et UNNA, cellules plasmatiques 428
VAN ERMENGEM, cils et flagella. . . 471
VAN GEHUCHTEN, ganglions sympathiques, imprégnation de GOLGI 389
— œuf d'*Ascaris*. 365
VAN GIESON, éclaircissement de coupes à la celloïdine. . . 228
— essences éclaircissantes. 256
— formol. 66
VAN HEURCK, styrax et liquidambar. 279
VASALE, hématoxyline d'après WEIGERT. 418
VEJAS, coloration des centres nerveux 408
VERWORN, méthode de narcotisation. 17
VIALLANES, chorure d'or. 172
— hématoxyline. 475
— histolyse des Diptères. 349
— inclusion au collodion. 224
— yeux des Insectes. . . 447
VIGNAL, préparation du picro-carmin. 80
VIGNAL et RANVIER, mélange fixateur 30
VILLE, masse d'injection 294
VIRCHOW (HANS), action de la lumière sur les objets chromiques. 33
VIVANTE, imprégnation de dents. 430
VOGT et YUNG, Annélides. 453
— — Cestodes. 450
— — Holothurides. . . . 465
— — Rotateurs 452
— — *Sipunculus*. 452
VON RATH, mélange fixateur. . . 57

Digitized by Google

Pages.
VON EBNER, liquide décalcifiant . . 430
VON GRAFF, Rhabdocœles 448
VON LENDENFELD, Éponges 465
VON LENHOSSÉK, voyez LENHOSSÉK .
VON MAEHRENTHAL, imprégnation par l'osmium 176
VON NATHUSIUS, poils et ongles . . 369
VON WISTINGHAUSEN, embryologie des Lombrics 349
— hématoxyline de Kleinenberg. 105
— neutralisation des tissus colorés par l'hématoxyline. 97
VOSMÆR, imprégnation d'Éponges. 168
VOSSELER, albumine de MAYER . . 242
— térébenthine de Venise 279

W

WADDINGTON, études des Infusoires 470
— gomme arabique pour coller les coupes . 243
WALDEYER, limaçon 384
— liquide décalcifiant. . 320
— Plasmazellen 425
WALSEM, coupes en séries 244
— hématoxyline de PAL. . . 419
— masse d'inclusion . . . 215
WARD, narcotisation. 20
— *Sipunculus*. 452
WASHBURN, embryologie des Gastéropodes 347
WATASÉ, embryologie des Céphalopodes 346
WATNEY, dichroïsme de l'hématoxyline 96
WEBB, méthode de congélation. . 234
WEBER, Échinides 456
— Holothurides. 456
— Rotifères 452
— Siphonophores. 463
WEBSTER, inclusion à la paraffine 201
WEDL, orseille. 110
WEIGERT, brun Bismarck 142
— colorations à l'hématoxyline. 413 et suiv.
— — (méthode de 1885). 413
— — (méthode de 1891). 415
— — (variantes, d'autres auteurs). 416 et suiv.
— coloration de la fibrine . 435
— coloration de la névroglie. 476
— durcissement des centres nerveux. 399

Pages.
WEIGERT, éclaircissement de coupes à la celloïdine 228
— formol 65
— méthode pour monter les coupes en séries . . . 247
— picro-carmin 86
— vernis pour montage de coupes 280
WEIL, méthode de coupes 233
WEISKER, inclusion au savon. . . 216
WEYSSE, embryologie de *Sus scrofa* 335
WHEELER, embryologie des Blattides 349
WHITE, dents 430
WHITMAN, embryologie des Amphibiens . . 340, 341
— — de la Clepsine. 349
— — des Poissons osseux . . . 344
— étude des Hirudinées. . 454
— Schnittstrecker. 209
WICKERSHEIMER, liqueur conservatrice. 265
WIEGER, méthode pour coller les coupes 244
WILL, embryologie des Aphides . 348
WILSON, étude des Alcyonaires. . 459
WILSON, embryologie des Lombrics. 350
WINTERSTEINER, coupes en séries de WEIGERT 249
WISTINGHAUSEN (VON), embryologie des Lombrics 350
WISSOWSKY, coloration des éléments du sang 434
WITT, gomme laque 286
WLASSAK, coupes en séries. . . 238
WOLFF, plaques motrices. 377
— vessie de la Grenouille. . 380
WOLTERS, cartilage. 432
— hématoxyline de KULTSCHITZKY 418
— imprégnation au vanadium 394
— nerfs intra-épidermiques 370
— tissu élastique. 429
WOODWARD, carmin au borax. . . 87
WOODWORTH, inclusion à la paraffine. 206
WRIGHT et MACALLUM, *Sphyranura*. 451

Z

ZACHARIAS (O.), alcool acétique . . 58
— carmin 84

Digitized by Google

Pages.
ZACHARIAS (O.), œuf d'*Ascaris*. . . 365
ZACHARIAS (E.), microchimie de la cellule 358
ZENKER, liquide fixateur 52
ZENTHOEFER, tissu élastique. . . . 429
ZIEGLER, mastic de. 287
ZIEHEN, modification de la méthode au sublimé de GOLGI . . 422
ZIEHL, fuchsine carbolique. . . . 137

Pages.
ZOJA, bioblastes d'Altmann. . . . 365
ZSCHOKKE, benzoazurine 138
— benzopurpurine 156
— cartilage 432
ZUR STRASSEN, *Bradynema* 145
ZWAARDEMAKER, méthodes cytologiques 365
— solution de safranine 129

Digitized by Google

TABLE ALPHABÉTIQUE DES MATIÈRES

A

Pages.

Acanthocéphales. 451
Acétate de potassium, liquide conservateur. 261
— d'urane 59
Acide acétique, comme fixateur . . 58
— carbonique, comme anesthésique. 19
— carminique. 77-80
— — pour centres nerveux. . 410
— chlorhydrique, comme décalcifiant 319, 321
— — pour dépigmentation . . 324
— chromique, propriétés . . . 31
— — (action de la lumière sur les tissus durcis par l'). 33
— — comme décalcifiant . . . 321
— — comme durcissant . . . 32
— — comme fixateur . 31 et suiv.
— — pour macérations 314
— — blanchiment des pièces . 33
— chromique et alcool, comme durcissant 34
— — — pour fixations 34
— chromique avec bichromate de potasse 42
— — pour décalcification. . . 321
— chromo-acétique. 34
— — acéto-osmique. 35-40
— — chlorhydrique, pour décalcification. 321
— — formique. 35
— — nitrique 41
— chromo-osmique. 35

Pages.

Acide fluorhydrique, pour désilicification 323
— formique, comme fixateur . 58
— iodique 436
— lactique, comme décalcifiant. 320
— nitrique, pour corrosions . 318
— — comme décalcifiant. 320, 321
— — pour dépigmentation . . 324
— — comme durcissant . . . 40
— — comme durcissant des centres nerveux . . . 402
— — pour fixations . . 40 et suiv.
— — pour macérations. . . . 316
— — et chlorate de potasse, pour macérations . . 316
— osmique, comme fixateur . 27 et suiv.
— — pour centres nerveux . . 402
— — pour imprégnations. 174, 176
— — pour macérations. . . . 315
— — et alcool, pour fixer. . . 30
— oxalique, pour macérations. 316
— phénique, comme éclaircissant. 256
— phosphorique, comme décalcifiant 320
— picrique, comme colorant. 157, 178
— — comme décalcifiant. . . 322
— — comme fixateur . 54 et suiv.
— picro-chlorhydrique 57
— — chromique 35
— — nitrique 56, 57
— — osmique 57
— — sulfurique 55
— — — pour décalcification. 322

Digitized by Google

Pages.
Acide picro-sulfurique avec sublimé corrosif 51, 52
— pyroligneux, comme décalcifiant. 320
— sulfureux, pour blanchiment. 325
— sulfurique, pour macérations. 316
Acidophilie 358
Acœles (Rhabdocœles). 448
Actinies, narcotisation et fixation. 15-17
— méthodes d'Andres . . . 458
— — des Hertwig . . 315, 458
Agar-agar, pour coupes en séries. 244
Agents décalcifiants . . . 319 et suiv.
— durcissants . . . . 26 et suiv.
— éclaircissants . 9, 251 et suiv.
— — emploi 251
— — choix 252
— — classification 252
— — pour la celloïdine . . . 227
— fixateurs . . . . 4, 22 et suiv.
— — pour études cytologiques . . . . 359 et suiv.
— — pour l'embryologie . . 327 et suiv.
Albumine, pour coller les coupes. 241, 242
— (inclusions à l') 235
Albuminoïdes (réactions microchimiques des) 356
Alcool, généralités 60
— tableau pour diluer. . . . 61
— les titres usuels 60
— pour anesthésier les animaux. 17
— comme liquide conservateur.. 8
— comme durcissant 64
— comme fixateur. 60-63
Alcool absolu, préparation 62
— acétique 58
— acidulé. 63
— au tiers 63, 312
— dilué, pour macérations. . 312
— iodé, comme durcissant . 402
— méthylique, pour anesthésier 17
— picrique 57
Alcyonaires 459
Alcyonella. 17
Alcyonium. 14, 460
Aldéhyde formique, voyez *Formol*.
Alumine, acétate. 261
Alun, comme fixateur 46
Amaranthe 116
Amarœcium 440
Améthyste 436

Pages.
Amidon pour injections 310
Amphibiens (centre nerveux des). 405
— (embryologie des). 339 et s.
Amphichœrus 449
Amphioxus 375
Amphipodes (embryologie des). . 349
Amphiura, embryologie 458
Ammoniaque (bichromate d') comme durcissant. 46, 401
— (chromate neutre d'). 46
Amyloïde (matière) 140, 143
Anesthésie, méthodes pour la produire chez les animaux contractiles. 14 et s.
— chez les Tardigrades . 447
Aniline (huile de), comme éclaircissant.. . . . . 228, 257
— « blue-black ». 115, 159
— — pour centres nerveux . 407
— (couleurs d') en général. 114 et s.
— (dérivés de l') 114
Anis, huile, comme masse d'inclusion. 235
Anneaux histologiques. 164
Annélides . . . . . 34, 35, 453 et suiv.
Antennes des Chilognathes. . . . 445
Anthracène, dérivés 115
Antipathes 459
Aphides (embryologie des). . . 348
« Arabine » de Waddington, pour coller les coupes 243
Araignées (embryologie des). . . 349
Archoplasma. 364
Argent (nitrate d'), pour imprégnations. . . . 163 et suiv.
— (autres sels d'). 167
Arthropodes. . . . . 444 et suiv.
— (embryologie des). 347 et s.
— (yeux des) 446
Ascaris (œufs d'). 365
Ascidies. 440
Asphalte pour injections. 310
Asphyxie des animaux contractiles. 19
— des Tardigrades 447
Astérides 456
Astroides 459
« Auréoline », pour dépigmentation. 324
Auriculaires. 457
Aurine 120
Axolotl, œufs 341
Azaléine. 116

B

Bains-marie, pour inclusions . . 204
Basophilie. 358

Digitized by Google

Pages.
Batraciens, centres nerveux . . . 405
Baumes. . . . . 274 et suiv.
Baume de Canada. 275
— — comme bordure. 285
— de Tolu 287
Bengaline 159
Benzoazurine 138
Benzopurpurine 155
Benzol, comme éclaircissant. . . 257
Bétanaphtholorange 138
Bichlorure de mercure, comme fixateur . . . . 47 et suiv.
— — (liquides conservateurs au) . . . . . 261 et suiv.
Bichromate d'ammoniaque, comme durcissant 46, 401
— de potasse, comme durcissant. 42 et suiv.; 400 et suiv.
— — pour fixations . . 42 et suiv.
— — pour macérations 314
« Biebricher Scharlach ». 157
Bi-iodure de mercure 273
Bipinnaires 457
Bitume de Judée 283
« Blackley blue » 159
Blanc d'œuf comme liquide additionnel 260
— (inclusions au) . . . 235
— (injections au). . . . 305
Blanchiment . . . 31, 33, 323 et suiv.
Blatte (embryogénie de la). . . . 348
Bleu alcali 424
— d'aniline. 158
— — et safranine. 185
— de Berlin. 298, 308
— carmin. 160
— de Chine 159, 396
— coton. 159
— Coupier 159
— lumière 158
— de Lyon 158
— de méthyle. 159
— de méthylène. . . . 144 et suiv.
— — pour imprégnations nerveuses. . . 146 et suiv.
— — avec fuchsine. 191
— — avec éosine 191
— — pour centres nerveux . 409, 420
— — pour cellules plasmatiques et Mastzellen. . 427
— noir 159
— de nuit. 158
— de Parme 158
— de Prusse pour imprégnations 177

Pages.
Bleu de Prusse pour injections. 297-300
— — pour colorations. . 185, 192
— de quinoléine. 158
— soluble. 159
— de toluidine 117, 138
— Victoria 133, 185
— — pour tissu élastique . . 428
Bleus de rosaniline 117
— de triphénylrosaniline. 117, 159
— trisulfoconjugués 159
Blue-black. 159
— pour centres nerveux . . 407
Bordeaux 119, 157
— G. 119
— R. 157
Bordures . . . . . 282 et suiv.
— au baume et au damar 285
— à la gélatine. 282
— à la paraffine 285
— à la térébenthine . . . 284
Bradynema rigidum 451
Brun Bismarck. 142
— — en coloration vitale. . 72-74
— — en coloration régressive 138
— — pour l'étude des Infusoires 468
— — avec vert de méthyle. . 190
— de naphthylamine. 409
« Brunswick black ». 283
Bryozoaires 441
Bugula 441

C

Callianira. 464
Campanulaires 461
Caoutchouc, pour coller les coupes 245
Carbonate de potassium, comme dissolvant de la nucléine. . . . 356
Carmalun 80
Carmin . . . . . 77 et suiv.
— avec colorants secondaires. . . . . 179 et suiv.
— à l'acide phosphomolybdique 410
— au sulfate de zinc 410
— à l'urane 410
— d'indigo 110
— — pour cartilage et tissu osseux 432
— — avec carmin-borax . . 179
Cartilage . . . . . 431 et suiv.
Caryophyllia 459, 460
Cassiopeia. 461
Cellepora 441

Digitized by Google

Pages.
Celloïdine, propriétés 219
— (inclusions à la) 218 et suiv.
— nouvelle méthode par éclaircissement avant les coupes. 229
— méthode rapide de Gilson 230
— pour injections 309
Cellules à granulations, ou « plasmatiques » ou « Mastzellen ». . . . 424 et suiv.
— caliciformes. 437
— glandulaires. 437
Centres nerveux. . . . . 398 et suiv.
— colorations générales. 407-412
— — spécifiques. . 412-422
— coupes 405
— — demi-éclaircissement des coupes . . 422
— des Reptiles et Amphibiens. 405
— durcissement. 397 et suiv.
— fixation 399
— inclusion. 405
— montage des coupes (Weigert et autres). 247 et suiv.
— préparation par compression 422
Céphalopodes (yeux des). 443
— (embryologie des). 345
Cercaires 451
Cerveau, voyez *Centres nerveux*.
Cervelet, voyez *Centres nerveux*.
Cestodes 450
Chætopteridæ 454
Chaleur (fixation par la) 15
Chilognathes (antennes des) . . . 445
Chinablau. 159
Chitine, procédés pour la rendre perméable. 318, 445
Chitonides (yeux des) 443
— embryologie. 347
Chloral, pour anesthésier les animaux 17
— (liquides conservateurs au). 264
— pour macérations 313
— (sirop au). 260
Chlore, pour dépigmentation et blanchiment. . . . . 323 et suiv.
Chloroforme, comme éclaircissant 257
— pour anesthésier les animaux. 16
Chlorure de magnésium pour narcotisation. 18
Chlorure de manganèse 355
— d'or (imprégnation par) 169 et suiv.
— — pour centres nerveux. 422
— de palladium 53
— — pour nerfs 393
— — pour les Infusoires. . 470
— de platine. 52
— — et acide osmique. . . 53
— — et acide chromique. . 42
— — et bichromate 45
— de sodium, pour macération 312
— — solution physiologique. 260
— — et alcool pour macérations. 312
— de vanadium 394
— de zinc, comme durcissant 53
Chou rouge 113
Chromate d'ammoniaque, pour durcissements. 46
Chromate de plomb, pour imprégnation 177
Chromatine (réactions de la). 355-359
Chrome (sels de), comme fixateurs pour les noyaux. 360
« Chromogen » 476
Chrysaurêine 138
Chyséoline. 118
Ciona 440
Citron (jus de), comme fixateur. 58
Cire et huile, pour inclusions. . 406
Cladocora 459
Clasmatocytes 474
Clavellina 440
Clepsine. 454
— (embryologie de la) . . . 349
Cocaïne 18
Coccides (étude des). 445
Cochenille, théorie. 79
— de Czokor. 83
— de Mayer 89
— de Partsch. 83
— de Rabl 83
Cœlentérés . . . . . 458 et suiv.
— (embryologie des). . 351
Coings (mucilage de), pour coller les coupes. 244
Collage de coupes en séries, voyez *Coupes en séries*.
— d'étiquettes sur le verre . 473
Collagène, substance 423
Collines de Doyère 447
Collodion (inclusions dans le). 218 et suiv.

Digitized by Google

Pages.
Collodion, pour coller les coupes. 238-239
— et paraffine, inclusion double 230
Collodionnage de coupes fragiles. 211
Colophane, pour inclusions . . . 233
— (solution de). 278
— (lut de) 285
Colorants régressifs 122, 128 et suiv.
— progressifs . . 139 et suiv.
Coloration, généralités et théorie. . . . . 68 et suiv.
— méthode de Flemming . 122 et suiv.
— régressive . . . 122 et suiv.
— par « substitution ». . 124
Colorations combinées . . 178 et suiv.
— cytologiques. . 362 et suiv.
— « mates » et colorations « transparentes ». . 126
— plasmatiques. . 134-136, 144 et suiv., 111, 363
— « vitales ». . . 72, 145, 146
Comatules (larves de) 457
Congélation (masses à) 233 et suiv. 398
Congoroth. 155
Convoluta 448
Copépodes. 445
Copilia 445
Coquille des Mollusques. 444
Coralline. 116
Cornée, préparation. 372, 373
Corpuscules de Herbst. 371
— de Golgi 377, 378
— tactiles 370, 371
Corrosion (méthodes de). . . 318, 319
Couleurs de la houille (méthode de coloration par les) 122 et suiv.
— « acides » et « basiques » 120 358
— classification. . 114 et suiv.
— choix d'une teinture . . 126
Coupes (collodionnage de). . . . 211
— en chaîne 210
— (enroulement de). 208
— en séries, méthodes pour coller . . . . . 236 et suiv,
— (nettoyage de). 212
— par la méthode de la congélation. . . . 233 et suiv.
— (reconstruction de) . . . 329
Créosote, comme éclaircissant. . 256
— pour dépigmentation . 324
Crinoïdes, larves. 458
Criodrilus lacuum 453
Cristallin, durcissement 374

Pages.
Cristallin, macération. 316
Cristatella. 441
Crocéine. 119
Crustacés (Copépodes, larves de Décapodes, Ostracodes 445
— (embryologie des). . . 349
Cténophores. 464
Cucumaria. 455
Cuivre (sulfate de), comme durcissant. 46, 462
Curare. 352
Cyanine. 158
Cyanure de potassium, comme dissolvant de la nucléine. . . . 356
Cyclostomes (embryologie des). . 344
Cylindraxes. 385 et suiv., 396, 420 et suiv.
Cynthia. 440
Cytologie (méthodes en). 352 et suiv.
— cellules fraîches. . . . 354
— cellules vivantes . 352, 354
— colorations 362, 363
— (méthodes de fixation en). . . . . 359 et suiv.
— réactions microchimiques. 355

D

Dahlia. 132
— pour cellules plasmatiques 425 426
Damar (ou Dammar, ou d'Ammar) (résine de) 277
— comme bordure 285
Décalcification . . . 319 et suiv., 384
Décapodes (larves de) 445
Deltapurpurine 155
Dendrocœles. 448
Dendrophyllia. 459
Dents, étude de leur développement 432
— non décalcifiées (coupes de) 429
Dépigmentation. . . . . 323 et suiv.
— méthode de Grenacher. . . 443
— par le chloroforme 445
Déplissement de coupes. 210
Déshydratation des préparations. 8
Desmognathus, centres nerveux . 405
Désilicification. 323
Dextrine (inclusion à la) . . 232, 234
Différenciateur de Cobb 6
Diffusion, courants dans les préparations. 5
Digestion, comme méthode pour l'étude du noyau . . 357

Digitized by Google

Pages.
Digestion (liquides pour la) . . . 317
Dinitrosorésorcine. 157
Diptères (histolyse des) 349
Durcissements. . . . . 24 et suiv.

E

Eau anilinée. 129
— distillée, comme liquide additionnel 258
— de Javelle pour corrosions. 318
— — pour les Nématodes . . . 451
— de Labarraque pour corrosions. . . 318
— — pour les Nématodes. . . . 451
— oxygénée, pour blanchiment. 31
— — pour dépigmentation . . . 324
— régale, pour la préparation d'Annélides 454
Écarlate impérial 157
Échinodermes. . . . . 455 et suiv.
— (embryologie des) 351, 457
— (œufs des) 365
Échinorhynques 451
« Echtgelb » 157
« Echtroth » 138
« Echtgrün » 157, 396
Éclaircissement en général . . . 9
et voyez *Agents éclaircissants*.
— de coupes à la celloïdine. 227
Écorce cérébrale. 388
Embryologie, méthodes générales, 326 et suiv.
— Agents fixateurs. . . . 327
— des Amphibiens. . 339 et suiv.
— des Amphipodes. 349
— des Aphides. 348
— des Araignées 349
— des Arthropodes. . 347 et suiv.
— des Céphalopodes 345
— de la Clepsine. 349
— des Cœlentérés 351
— des Cyclostomes. 344
— des Diptères. 349
— des Échinodermes. . 351, 457
— des Éponges. 351
— des Gastéropodes 346
— des Lépidoptères. 348
— des Lombrics 349
— des Mammifères. . 331 et suiv.
— des Mollusques . . 345 et suiv.
— des Oiseaux. . . . 335 et suiv.
— des Phalangides. 349
— des Phryganides. 348
— des Plagiostomes 344

Pages.
Embryologie des Planaires. . . . 350
— des Poissons osseux 342 et suiv.
— des Reptiles. 339
— des Ténias. 350
— des Tuniciers 345
— des Vers . . . . . 349 et suiv.
Encéphale, voy. *Centres nerveux*.
Encre de Chine pour injections . 308
Endosmose 5, 258
Enrobage (méthodes d'). 193 et suiv.
Éosine. 156
— pour corpuscules sanguins 434 435
— en coloration combinée 190 et suiv.
— hématoxylique 181
Épiploön 164
Épithéliums. . . . . 367 et suiv.
Épithélium cilié. 443
Éponges. 465
— (embryologie des) . . . 351
Érythrosine. 156
Essence de bergamote. 255
— de bois de cèdre 254
— de bois de santal 256
— de cannelle 255
— de girofle 254
— d'origan. 256
— de térébenthine. 256
— de thym. . . . 227, 228, 256
Essences éclaircissantes diverses. 253 et suiv.
Éthérisation 16, 17, 352
Étiquettes (collage des) 473
Etuves pour inclusions 204
Eunice. 454
Extension . . . . . 13 et suiv.

F

Fer, perchlorure. 53, 176
Fécondations artificielles 330
Fibrine 435
Fixateurs, classification 23
— cytologiques 359
Voir aussi *Agents fixateurs*.
Fixation (généralités sur la) . . 4, 12
— (pratique de la). 13, 20 et suiv.
— des animaux marins . . 22
— d'animaux très contractiles . . . . . 14 et suiv.
Flagella d'Infusoires 470
Flustra 441
Foie 437
Formaline. . . . . 64, 472 5.
— comme mordant . . . 135

Digitized by Google

Pages.

Formol, voyez *Formaline*.
Fournisseurs 76
Francéine 160
Fuchsine 137
— carbolique 137
— et bleu de méthylène . . 191
— acide (« Sœurefuchsine »). 154
— — pour éléments nerveux 396, 420
— — en coloration combinée . . . . . 185 et suiv.
Fuseau karyokinétique . . . 363, 364

G

Ganglions sympathiques 388
Gastéropodes (embryologie des) . 346
— (fixation des) . . . 441
— (yeux de) 442
Gélatine, masses d'inclusion . . . 216
— pour coller les coupes en séries 244
— pour luter les préparations 282
Gelées à la glycérine . . 270 et suiv.
Gentiane (violet de) 131
Géphyriens 452
Glandes . . . . . 436 et suiv.
Glu marine 284
Glucose de Brun. 267
— de Fabre-Domergue . . . 267
Glycérine 268
— extra-réfringente . . . 269
— gélatinée de Braun. . . 451
— gélatinée, médiums conservateurs . . 270 et suiv.
— et alcool, liqueurs conservatrices . . . 263, 270
« Gold-size ». 284
Gomme arabique, pour coller les coupes 243
— (inclusions à la) 231
— masses à congélation . . 233
— à l'alun de chrome pour coller les coupes. . . . 243
— pour coller les étiquettes. 473
Gomme-copal, pour inclusions. . 232
Gomme-laque (inclusion à la) . . 232
— pour coller les coupes . 240
— pour injections. 310
— lut 286
— sandaraque. 280
Gorgonia. 460
Graisse, osmiquée. 10, 424
Grenouille (œufs de la). 340
— langue de. 372

Pages.

Grenouille, vessie 379
Guernsey blue. 159
Gutta-percha, pour coller les coupes 245

H

Halicryptus 452
Helix 18
— embryologie. 346
Hémacalcium 103
Hémalun 98, 99
— alcoolique. 104
Hématéate d'ammoniaque 94
Hématéine . . . . . 94 et suiv.
Hématoxyline . . . . . 92 et suiv.
— à la laque alunique. 98 et suiv.
— aux autres laques . 105 et suiv.
— en coloration combinée 181-185
— pour tissus nerveux, Weigert et autres. 413 et suiv.
— à l'acide phosphomolybdique de Mallory. 410
— dichroïsme des colorations 96
Hirudinées. 18, 454
Histolyse des Diptères. 349
Holothurides. 455
Houille (couleurs de la) . 114 et suiv.
Huile d'aniline 228, 257
— de lin, pour injections. . . 310
— d'olive et cire pour injections. 310
— de ricin, comme milieu conservateur. 279
Humeur aqueuse 260
Hydrate de chloral, comme agent conservateur 261
— pour anesthésier les animaux 17
— pour macérations 313
— sirop 260
Hydres 461
Hydroïdes. 461
Hydroxylamine pour narcotisation. 18

I

Imprégnations, en général. . . . 161 et suiv.
— théorie 162

Digitized by Google

Pages.
Imprégnations, d'animaux marins par l'argent . . 168
— du tissu nerveux d'après Golgi et autres. 385 et suiv.
— négatives et positives 161
— par le bleu de méthylène 153
— par l'argent . . . 163 et suiv.
— par le chlorure d'or . . 169 et suiv.
— par le chlorure de palladium . . . 393
— primaires et secondaires . . . 162
Voyez aussi *Chlorure d'or*, *Chlorure de palladium*, *Bleu de Prusse*, *Osmium*, *Nitrate d'argent*, *Perchlorure de fer*, etc. ».
Inclusions en général . . 193 et suiv.
— à l'albumine . 235 et suiv.
— au baume de Canada . 233
— à la celloïdine. 218 et suiv.
— au collodion . 218 et suiv.
— à la colophane, de Ehrenbaum 233
— par congélation. . . . 233 et suiv.
— à la dextrine. . . 232, 234
— double dans le collodion et la paraffine. 230
— à la gélatine . . . 216, 217
— à la gomme 231
— à la gomme-copal, de v. Koch. 232
— à la gomme-laque, de Hyatt 232
— à la paraffine. 200 et suiv.
— au savon. 215, 216
Indigène 159
Indigo. 110
— artificiel. 159
— substitute. 159
Induline. 159
Infusoires, méthodes diverses . . 466 et suiv.
Injections. . . . . 290 et suiv.
— masses à la gélatine, carminées. 293 et suiv.
— — bleues. 297-300
— — autres couleurs. 300-303
— masses à d'autres véhicules 305-310
— suivies de corrosions. 309

Pages.
Injections naturelles 310
— — d'Annélides . . . 454
— — d'Hirudinées. . . 455
— de Mollusques acéphales. 442
Insolation de solutions de sels métalliques 162
Intoxication. 14
Inversion, soi-disant, des colorations 136
Iode, comme fixateur 60
— pour la fixation d'Infusoires. 470
— solution fixatrice (solution de Lugol) 60
Iris, préparation. 379

J

Jaune acide, solide 157
— métanil. 157
Javelle, eau de 318
Jus de citron, pour fixations. . . 58

K

Karyokinèse, voyez *Cytologie* . .
Kernschwarz 111

L

Labarraque, eau de 318
Labyrinthe 383
Lacerta (œufs de) 339
Lamelles, méthodes de nettoyage. 472
Lamellibranches 441, 442
Langue de Grenouille 372
— de Lapin 372
Lapine (ovules de). 331, 333
Lécithine (réactions de la). . . . 356
Lépidoptères (embryologie des). . 348
Lévulose pour conservation . . . 267
« Lichtblau » 158
« Lichtgrün » 157
— et safranine. . . . 183
Limaçon (oreille-interne). 383
Limax (embryologie de la). . . . 346
Limule (yeux de) 446
Liqueurs, conservatrices. 260 et suiv.
— diverses, voyez les noms des auteurs . . . . .
Liquidambar 279
Liquides, additionnels. . 258 et suiv.
— conservateurs . id. id.
— de pénétration pour inclusions à la paraffine 200

Digitized by Google

Pages.
Liquides, digestifs. 317
— indifférents, leur composition. 258
— mercuriques, voyez *Sublimé* et *Bichlorure*.
— mercuriques conservateurs . . . . 261 et suiv.
— divers, voyez les noms des auteurs . . . . .
Lombrics (embryologie des) . . . 349
— terminaisons nerveuses 390
Loxosoma 441
Lut de gélatine 282
Luts et vernis. . . . . 281 et suiv.
Lumbricus. 453
Lysol, composition et emploi . . 316

M

Macérations et corrosions, etc. 311 et suiv., 474
Macération du tissu musculaire strié 375
— du tissu musculaire lisse 379
Macrotoma plumbea 447
Magdala. 120, 137
Magenta. 116
— acide. 154
Magnésium, chlorure pour narcotisation 18
Mammifères (embryologie des) 331 et suiv.
« Manchester Brown » 118
Manganèse (chlorure de). 366
« Marine glue » 284
Mastics . . . . . 281 et suiv.
Mastzellen 424-428
Mauvéine 115, 137
Médium, voyez *Liqueur*, *Liquide* et les noms des auteurs.
Méduses 461, 462
Mélanges divers, voyez les substances et les noms des auteurs.
Ménisques tactiles. 370
Mercure, voyez *Bichlorure* et *Sublimé*.
Méthylène (bleu de), voyez *Bleu de méthylène*.
Microchimie de la cellule . . 355-359
Microtomes 194
Milnesium. 447
Mitoses, voyez *Cytologie*.
Moelle, voyez *Centres nerveux*.
Moina (embryologie de) 349
Molgula. 440

Pages.
Molluscoida 441
Mollusques . . . . . 441 et suiv.
Molybdate d'ammonium 177
Mouche (yeux). 446
Mordançage 71, 72
— par le permanganate. 133
— par la formaline. . . 135
— par le tannin et le tartre stibié. . . . 135
Mordants, voyez *Mordançage*.
Mucilage de coings, pour coller les coupes 244
Mucine 436, 437
Muscles lisses. 379
— (coupes de) 375
— dissociation. 316, 375
— (terminaisons nerveuses dans). . . . . 376 et suiv.
Myéline, colorations spécifiques . 412 et suiv.
Myrtillus 113

N

Naphtaline (dérivés de la) 115
— rose de. 120
Naphte, pour inclusion à la paraffine 201
— pour nettoyage de coupes. 257
Narcotisation . . . . . 14 et suiv.
« Nebenkern » (étude du) 364
Nématodes 451
Némertiens 449
Nephelis. 454
Nerfs à myéline, 395, 396, 412 et suiv.
— colorations spécifiques. . . 412 et suiv.
— intra-épidermiques. 370
— périphériques. . . 385 et suiv.
— terminaisons dans les muscles. . . . . 376 et suiv.
— — dans les muscles lisses. 379-380
— — dans les tendons 377
Nettoyage des lames et lamelles. 472
« Neutralroth » 156
Névroglie (étude de la) . . . 422, 475
Nicotine (narcotisation par la) . . 16
Nigraniline 159
Nigrosine 138
— pour centres nerveux . 409
— et safranine 185
Nitrate d'argent (imprégnations par) . . . . . 163 et suiv.
— — méthodes de Golgi. 385-393, 410-412

Digitized by Google

Pages.
Nitrite d'amyle comme vaso-dilatateur. 290
Noir d'aniline 159
— pour centres nerveux. . . . 408
Noir Brunswick. 283
Noir Colin pour centres nerveux. 408
Noyau, voyez *Cytologie*.
— vitellin 364
Nucine 113
Nucléine (dissolvants de la) . . . 356
— (réactions de la) . . 355-359
Nucléo-albumine. 358

O

Oceania 461
Œuf, voyez *Embryologie* et *Cytologie*.
Oiseaux (embryologie des). 335 et suiv.
Ongles 369
Onuphis. 454
Ophiures 456
Opisthotrema 450
« Orange III ». 157
— G. 119
— en coloration combinée. 183 184, 186-190
— méthode de Flemming. . 184
Orcéine 101
— pour épithéliums 369
— pour substance collagène 424
— pour tissu élastique . . . 428
Oreille interne. 382
Orientation d'objets dans la paraffine. 205
— — dans la celloïdine. . . . 222
Orseille 110
Orseilline. 138
Os décalcifiés . . . . . 430 et suiv.
— non décalcifiés. 429
Osmium, voyez *Acide osmique*
Osmose, manière d'en atténuer les effets 6
Ossification (ligne d') 431
Ovogenèse. 365
Oxygène, pour dépigmentation et blanchiment . . . 31, 323, 324, 325

P

Pæonine. 420
Palladium (chlorure de), voyez *Chlorure de Palladium*
Palythoa 460
Pancréatine pour digestions. . . 318
Papillæ foliatæ. 372

Pages.
Paracarmin 88
Paraffine (inclusion à la) 200 et suiv.
— résumé de la méthode 213
— (masses de). . . . 208, 214
— pour border les préparations 285
— (préparation de la) . . 214
Pecten, yeux 443
Pedicellina 441
Pennatulides 460
Pentacrines 458
Pepsine pour digestions artificielles 317
Perchlorure de fer comme fixateur 53
— — pour imprégnations. 176
Permanganate de potasse, comme macérateur . . . 314
— comme mordant. . . 133
Perophora. 440
Peroxyde d'hydrogène pour blanchiment. 31, 324
— de sodium 325
Phalangides 447
— (embryologie des). . 349
Phallusia 440
Phascolosomes 452
« Phénicienne » (la) 142
« Phenylenbraun ». 118
Phloroglucine, pour décalcification. 322, 384
Phloxine, voyez *Éosine*
Phoronis. 452
Phosphate bisodique, comme dissolvant de la nucléine . . . 356
Photoxyline (inclusion à la) . . . 219
Phryganides (embryologie des). . 348
Phtaléines. 115
Phyllosoma 445
Picro-carmin. 85
— comme liquide additionnel 264
Picro-nigrosine, pour centres nerveux 409
Plagiostomes (embryologie des) . 344
Plakina 351
Planaires (embryologie des) . . . 350
— (étude des) 448
Plaques motrices. 76, 377
Plasmazellen . . . . . 424 et suiv.
Plastine 358
Platine (chlorure de). 52, 53
Pluteus 457
Poils 369
— tactiles 371
Poissons osseux (embryol. des) 342 et suiv.
Polychètes 453

Digitized by Google

Pages.
Ponceau. 137
— RR. 157
Porifères 465
— (embryologie des) . . . 351
Porte-objets, méthodes de nettoyage 472
Potasse, pour corrosions. 318
— pour macérations. . . . 313
— (bichromate de), comme durcissant . . 42, 400, 401
voyez aussi *Bichromate de potasse* et *Liquide de Müller*.
— (permanganate de), comme macérateur. 314
— comme mordant 133
Poule, œufs . . . . . 335 et suiv.
Priapulus 452
Primerose. 120
Primula 117
Produits chimiques 75
Protopterus, centres nerveux . . 405
Protozoaires. . . . . 466, et suiv.
Protula 454
Purpurine. 110
Pyrénine 358
Pyridine. 64
Pyrosine 156
Pyrosoma 440

Q

Quinoléine. 158

R

Rauvarienne 138
Réactions microchimiques. . . . 355
Reconstruction d'objets au moyen de coupes. 329
Réfraction (indices de) des éclaircissants 253
Régénération de solutions osmiques 28
Reptiles (embryologie des) 339
— centres nerveux. 405
Résine damar 277
Résines. . . . . 274 et suiv.
Rétine . . . . . 381 et suiv.
Rhabdocœles 448
Rhopalea 440
Ribésine 113
Rocelline 138
Rosaniline (dérivés de la) 114
Rose Bengale 156
Rose B à l'eau. 156
Rose de naphtaline 120

Pages.
Roséine 116
Rotateurs 452
Rouge d'aniline 116
Rouge Congo. 119, 155
— pour nerfs. 393
— et fuchsine acide. . 186
Rouge fluorescent. 136
Rouge neutre. 156
Rubidine 119, 138
Rubine 116
Rubine S. 154
— en coloration combinée . . . . 186 et suiv.
Ruthénium (imprégnation par). . 177

S

« Sœurefuchsine ». 154
— pour éléments nerveux. . . . 396, 420
— en coloration combinée. . 186 et suiv.
« Sœuregelb ». 157
« Sœurerubin », voyez *Sœurefuchsine*.
« Sœureviolett » et safranine . . 183
Safran (teinture de). 110
Safranine . . . . . 128 et suiv.
— et bleu de méthylène pour centres nerveux . . . 421
— avec mordant. . . . 113-135
— en coloration combinée 183 et suiv.
Safrosine, voir *Éosine*.
Salamandre, entretien et observation des larves 353, 354
Salive artificielle de Calberla . . 313
Sang . . . . . 432 et suiv.
Sangsues 454
Sapphirina 445
Sarcolemme 375
Savon, masses d'inclusion. . . . 215
Schnittstrecker 209
Sel, solution de, comme liquide additionnel. 258
— solution physiologique . . . 260
Sérum, sérum iodé 259, 311
— de Kronecker 260
— iodé artificielle. . . 260, 311
Siphonophores. 462
Sipunculus 452
Sirop au chloral. 260
— phéniqué 261
— simple, comme liquide additionnel 260
Sirops divers 267

Digitized by Google

Pages.
Sodium, peroxyde. 325
Solferino 137
Solution de GANNAL. 261
— de LUGOL. 60
Voyez aussi *Liqueur*, *Liquide*, etc.
Soude caustique, pour corrosions. 318
— — pour macérations. 313
Spermatogenèse. 365
Spermatozoïdes (étude des). . . . 365
Sphyranura 451
Spirographis 454
Spongiaires 465
Sternaspidæ. 454
Styrax. 279
Sublimé (solutions fixatrices). . . 47 et suiv.
— platinique 328
— (imprégnation du cerveau par le) 410
— liqueurs conservatrices. 261 et suiv.
Substitution de couleurs dans la teinture. 124, 191
Sulfate de cuivre, comme durcissant. 46
Sulfocyanure d'ammonium ou de potassium. 474
Sycandra 351
Sympodium 460
Synaptes 456

T

Tabac (narcotisation par le) . . . 16
Tambours histologiques 164
Tanin, pour l'étude des Infusoires. 470
— solution conservatrice. . 264
Tardigrades (étude des). 447
Teintures (les diverses sortes de). 68
— choix de. 74
— par mordançage. 72
— (produits chimiques pour). 75
— progressives et régressives 69
— vitales. 72
Voyez aussi *Colorants*, et *Colorations*.
Tendons (terminaisons nerveuses dans) 377
Ténias 450
— (embryologie des) 350
Térébenthine de Venise, pour montage. . . . 279
— comme lut. 284
Terminaisons nerveuses, voyez *Nerfs*.

Pages.
Thionine 138
— réactif de la mucine . . 436
Thym (essence de). . . 227, 228, 256
Tiara 461
Tissu adipeux. 424
— conjonctif. . . . . 423 et suiv.
— élastique 428
— osseux. . . . . 429 et suiv.
Toluène, pour éclaircissement 201, 257
Toluidine (dérivés de la). 114
Tournesol 113
Trématodes 450
« Triacidlösung » d'EHRLICH . . . 189
Triænophorus nodulosus 450
Tropæoline O 118
— OOO 138, 157
Trypsine pour digestions 318
Tuniciers 440
— (embryologie des). . . 345
Turbellariés 448

U

Urane (acétate d') comme fixateur 59

V

Vanadate d'ammoniaque, injection. 308
Veretillum. 14
Vernis divers. . . . . 281 et suiv.
— copal comme milieu conservateur. 279
— photographique comme milieu conservateur. . . . 280
Vers. . . . . 448 et suiv.
— (embryologie des). . . 349, 350
Vert d'aniline, pour cellules mucipares. 437
— d'Alsace 157
— brillant. 157
— émeraude 135
— d'iode 141
— lumière. 117, 139
— de méthyle. 139
— — comme liquide additionnel. 264
— — comme colorant cytologique. 355
— — pour cellules mucipares. 437
— malachite. 157
— solide. 157
— thiophène 157
Vésicule embryogène 364
Vessie de la Grenouille. 379

Digitized by Google

Pages.

Vésuvine. V. *Brun Bismarck*
Vinaigre salicylique 265
Violet B. 158
— de gentiane. 131, 135
— — pour les plaquettes du sang. 433
— de Hofmann. 117
— de Lauth. 115, 138
— — pour la mucine 436
— de méthyle . 116, 135, 142, 158
— — pour corpuscules sanguins 433
— de méthylamine, violet de Paris. 142

W

Wagnerella 323
Wasserblau 159
— pour substance collagène. 424

Pages.

X

Xilidinponceau. 119
Xylol, comme éclaircissant en général 257

Y

Yeux des Arthropodes. 446
— des Astérides 456
— de Céphalopodes. 443
— de Chitonides 443
— de Gastéropodes. 442

Z

Zinc (chlorure de), comme durcissant 53
Zoanthaires, méthodes de Braun. 460
— à squelette calcaire. 459
Zoobothrium. 441

Digitized by Google

Digitized by Google

TABLE DES MATIÈRES

Pages.

PRÉFACE DE M. RANVIER V

AVANT-PROPOS DE M. A. BOLLES LEE VII

AVANT-PROPOS DE LA 1re ÉDITION DE M. HENNEGUY XI

PREMIÈRE PARTIE

MÉTHODES GÉNÉRALES ET RÉACTIFS

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION 1

CHAPITRE II

EXTENSION, FIXATION ET DURCISSEMENT 12

CHAPITRE III

AGENTS FIXATEURS ET DURCISSANTS : ACIDES MINÉRAUX ET LEURS SELS . 27

CHAPITRE IV

AGENTS FIXATEURS ET DURCISSANTS : CHLORURES 47

CHAPITRE V

AGENTS FIXATEURS ET DURCISSANTS : ACIDES ORGANIQUES ET AUTRES AGENTS 54

CHAPITRE VI

DES TEINTURES 68

Digitized by Google

CHAPITRE VII

Carmin et cochenille 77

CHAPITRE VIII

Hématoxyline (hématéine) et autres colorants végétaux 92
Laques aluminiques 98
Autres laques 105
Autres colorants végétaux 110

CHAPITRE IX

Des couleurs de la houille et des colorations régressives 114
Tableau des couleurs de la houille 115

CHAPITRE X

Safranine et autres colorants nucléaires 128
Colorants régressifs 128
Colorants progressifs 139

CHAPITRE XI

Bleu de méthylène et autres colorants plasmatiques 144
Bleu de méthylène 144
Autres colorants plasmatiques 154

CHAPITRE XII

Des imprégnations 161
Argent 163
Or 169
Acide osmique et autres 174

CHAPITRE XIII

Colorations combinées 178

CHAPITRE XIV

Méthodes d'inclusion 193

CHAPITRE XV

Inclusion a la paraffine et masses semblables 200

CHAPITRE XVI

Collodion (celloïdine), gomme, gomme-copal, etc 218

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

Digitized by Google

UNIVERSITY OF MICHIGAN
3 9015 06971 3298

Digitized by Google

Digitized by Google